

**Analytische Methoden zur Identifizierung  
von  
Inhaltsstoffen Baltischen Bernsteins**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

genehmigte  
**D i s s e r t a t i o n**

von Marianne Tauber  
aus Kenzingen/Emmendingen

1. Referent: Prof. Dr. S. Schulz

2. Referent: Prof. Dr. U. Engelhardt

eingereicht am: 03.07.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.08.2000

2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Juni 2000 an der Technischen Universität Braunschweig unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz angefertigt.

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
amu	atom mass unit
B	Basepeak
DC	Dünnschichtchromatographie
DSC	Differential Scanning Kalorimeter
FTIR	Fourier Transformed Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
GPC	Gel Permeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I.D.	Innendurchmesser
IR	Infrarot
M <sup>+</sup>	Moleküllenpeak
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
NMR	Kernresonanzspektroskopie
präp.	präparativ
Py	Pyrolyse
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	...	1
1.1	Historische Geologie und Paläontologie	...	3
1.2	Historischer Überblick	...	7
1.3	Forschungsstand	...	12
2	Themenstellung	...	18
3	Analytische Methoden	...	19
3.1	<b>Direkte Analyse von Bernstein</b>	...	21
3.1.1	Pyrolyse	...	21
3.1.1.1	Pyrolyse-Geräte	...	21
3.1.1.2	Allgemeine Darstellung der Reaktionsmechanismen	...	24
3.1.1.3	Pyrolyse des Bernsteins	...	26
3.1.1.4	Bernsteinpyrolyse mit GC-FTIR-Kopplung	...	28
3.1.2.	Photochemische Degradation	...	28
3.2	<b>Analyse löslicher Bestandteile</b>	...	33
3.2.1	Probenaufbereitung	...	33
3.2.1.1	Extraktion von Bernstein	...	33
3.2.1.2	Derivatisierung von Bernstein und seinen Extrakten	...	36
3.2.2	Fraktionierung mit chromatographischen Methoden	...	37
3.2.2.1	Sephadex	...	39
3.2.2.2	Silbernitratthaltige Kieselgelsäulen	...	39
3.2.2.3	HPLC	...	40
3.2.3	Instrumentelle Analytik	...	43
3.2.3.1	GC-MS	...	44
4	Vergleichsexperimente mit Kiefernharz	...	47
5	Ergebnisse	...	49
5.1	Pyrolyse	...	49
5.1.1	Py-GC-MS	...	49
5.1.2	Py-GC-FTIR	...	64
5.2	Photochemische Degradation	...	68
5.3	Säulenchromatographische Fraktionierung	...	68
5.4	HPLC	...	70

5.5	Ergebnisse der Massenspektrometrie	... 81
5.6	Polymerisationsversuche mit Kiefernharz	... 88
6	Zusammenfassung	... 93
7	Diskussion	... 98
8	Experimenteller Teil	... 108
8.1	Arbeitsmittel und -geräte	... 108
8.2	Beschreibung der Proben	... 112
8.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	... 113
8.4	Synthese der Referenzsubstanzen	... 114
9	Literaturverzeichnis	... 116
10	Anhang	... 120

## 1 Einleitung

Bernstein übt seit frühen Zeiten eine große Faszination auf Menschen aus, wie prähistorische Funde und historische Quellen belegen. Sein Name, der sich aus dem Mittelhochdeutschen von seiner Brennbarkeit ableitet, steht als ein Sammelbegriff für fossil erhärtete Baumharze. Herkunft, Alter und seine physikalischen Eigenschaften weisen eine große Bandbreite auf. Die im folgenden dargelegten Charakteristika gelten für den in dieser Arbeit untersuchten Baltischen Bernstein und sind nur bedingt auf andere Bernsteinvorkommen zu übertragen [1].



**Abb. 1:** Baltischer Bernstein aus Südschweden [5]

Für den Baltischen Bernstein können die folgenden physikalischen Eigenschaften umrissen werden [1, 2, 3, 4]:

1. Die Farbvariation ist sehr umfangreich. Die ursprüngliche Farbe ist dabei gelblich, wobei die Farbnuance durch pflanzliche und tierische Einschlüsse sowie Verwitterungserscheinungen und optische Effekte wie Fluoreszenz und Lichtstreuung stark variieren kann. So sind neben den gelben weiße, rote, braune aber auch blaue, grüne und schwarze Bernsteine bekannt.

2. Bernstein ist ein weiches Material, welches sich gut verarbeiten läßt. Nach der Mohs-Härteskala beträgt die Härte je nach Bernstein zwischen 2 und 3. Eine Ursache für die Variabilität liegt im Feuchtegehalt, der reziprok proportional zur Härte steht. Der Verwitterungsgrad eines einzelnen Bernsteines ist ebenfalls von Bedeutung. Je dichter die Verwitterungskruste ist, desto härter wird das Material.

3. Dichte und Thermoplastizität: Da sich der Bernstein aus inhomogenen Inhaltsstoffen ohne ein festes Kristallgitter zusammensetzt, können nur Bereiche angegeben werden. Die Dichte liegt zwischen 1,04-1,10 g/cm<sup>3</sup>, maximal bei 1,3 g/cm<sup>3</sup>. Das damit verbundene charakteristische niedrige Gewicht ermöglicht es, daß der Bernstein schon bei einer geringen Salinität schwimmt und so an den Küsten der Ostsee angeschwemmt wird.

Wegen seines amorphen Charakters weist der Bernstein einen sehr großen

Thermoplastizitätsbereich auf. So wird er bei 170°C plastisch verformbar, ab 300°C fängt der Schmelzprozeß an. Dieser kann, sofern vorher keine Zersetzung eintritt, bis 420°C fortschreiten.

4. Weitere physikalische Kennwerte sind eine blauweiße Fluoreszenz, Interferenzen in polarisiertem Licht (bei einem sonst isotropischen optischen Charakter) und Durchlässigkeit für Röntgenstrahlen. Der Brechungsindex liegt zwischen 1,515 und 1,545.

Die gemmologische Einteilung unterscheidet den Bernstein nach verschiedenen Varietäten wie Farbe und Transparenz. Zunächst wird jedoch nach seinem Fundort unterschieden: es gibt maritime oder Seebernsteine und Land- beziehungsweise Erdbernsteine. Seebernsteine weisen eine geringe Verwitterungskruste auf, sie sind "blank poliert". Im Gegensatz dazu ist für den Landbernstein eine rauhe, dunkel rissige Verwitterungskruste typisch. In der nächsten Kategorie wird der Bernstein nach seiner Transparenz in sieben Varianten unterschieden. Der Grad der Durchsichtigkeit ist dabei von Größe, Anzahl und Anordnung der im Bernstein eingeschlossenen Gasblasen abhängig (Opaleszenz).

Die wertvollsten Steine weisen keine Luftblasen auf, sie sind vollkommen klar. Sie werden als "schiere Steine" bezeichnet. Bernsteine mit feinst verteilten Gasblasen sind "matte Steine", danach kommen "flumige Steine". Der bekannteste Vertreter des Ostseebernsteins ist der Bastard mit starken Trübungen. Im Gegensatz dazu hebt sich der "Knochenbernstein" durch seine weiße bis elfenbeinähnliche Farbe ab. Diese Varianten lassen sich für die Schmuckindustrie gut nutzen. Ist die Anzahl der Gasblasen zu hoch, ist der Stein sehr weich und nicht mehr polierbar. Es liegen dann die schaumigen und brackigen Steine vor. Letztere besitzen neben dem hohen Anteil an Gasblasen noch Pflanzenüberreste, vorwiegend Moose.



## 1.1 Historische Geologie und Paleobotanik

Als fossile Harze werden solche bezeichnet, die älter als 1 Million Jahre sind. Die bislang ältesten Bernsteine sind die österreichischen Bernsteine von Golling mit 120 Millionen Jahren (Unterkreide) und der Libanonbernstein mit 125 bis 130 Millionen Jahren [6]. Die jüngeren Stücke, zum Beispiel der Bitterfelder Bernstein mit 22 Millionen Jahren, stammen aus dem Unteren Miozän. Jüngere bernsteinähnliche Harze werden dagegen als Kopale bezeichnet. Kopale weisen einen höheren Schmelzpunkt und eine größere Härte auf. Diese subfossilen Harze sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Bernsteinvorkommen sind überall auf der Erde verteilt. Sie unterscheiden sich neben der Herkunft auch deutlich im Alter. Die ältesten fossilen Harze sind aus dem Karbon bekannt. Ihre Menge ist jedoch sehr gering; die Cordaiten und Farne sonderten nur kleine Harzpartikel aus. Erst mit der Evolution der Angiospermen (Bedecktsamer) und der Coniferen (Nadelbäume) im Perm ist die botanische Möglichkeit gegeben, größere Mengen an Harzen auszuscheiden. Die größten Harzabsonderungen fanden in Europa während der Kreide und des Tertiärs statt. Die Ursachen dieser erhöhten Harzproduktionen sind vielfältig. Ein wesentlicher Grund ist nach der Rindenbeschädigung durch Insektenbefall eine Klimaveränderung mit tiefgreifenden Einschnitten in den Umweltbedingungen, die zu Einflüssen auf die Stoffwechselphysiologie der Pflanzen führt. So konnte bei einer Zunahme von Wärme und Luftfeuchtigkeit bei rezenten Wäldern eine Erhöhung der Harzabsonderung beobachtet werden [7]. Weitere Faktoren sind Blitzeinschläge, Stürme, Staunässe, Erhöhung der Bodensalinität, Frühfröste und möglicherweise die klimatischen Ausläufer der paläozänzeitlichen Vulkanaktivitäten.

Bei der gesteigerten Harzproduktion sammelt sich das Harz in größeren Mengen in Hohlräumen unterhalb der Borke und außerhalb des Baumes an. Entscheidend für die Entstehung von Bernstein ist nun, daß das Harzkonglomerat relativ schnell unter Luftabschluß gelangt, sei es unter Wasser oder unter die Erdoberfläche, damit keine Oxidation und der damit verbundene aerobe Abbau des Harzes stattfinden kann.

Der bekannteste Bernstein in Europa ist der Baltische Bernstein mit einem Verbreitungsgebiet im gesamten Ostseeraum. Sein Alter wird zwischen 35 bis 49 Millionen Jahren datiert. Geologisch ist dieses die Periode des Paläogens

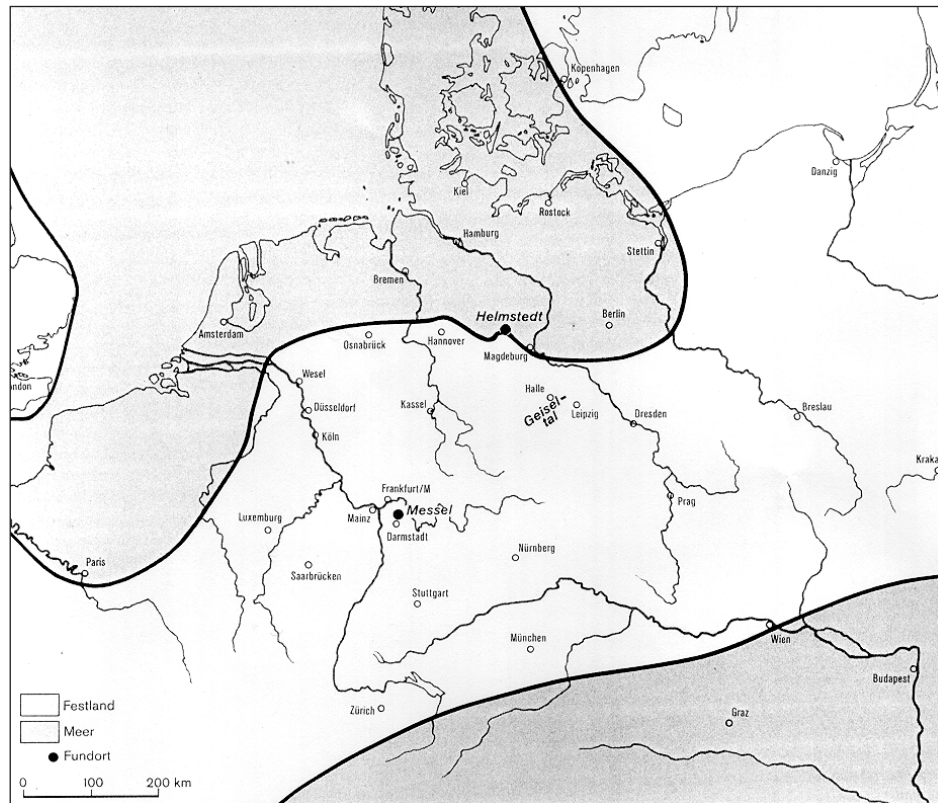
(Alttertiär, 65 - 23 Millionen Jahre), welches in das Paläozän, Eozän und Oligozän unterteilt wird (Tabelle 1). Daran schließt sich das Jungtertiär (23 - 1,6 Millionen Jahre) mit seiner Untergliederung in Miozän und Pliozän an.

**Tab. 1:** Übersicht über Oberkreide und Alttertiär

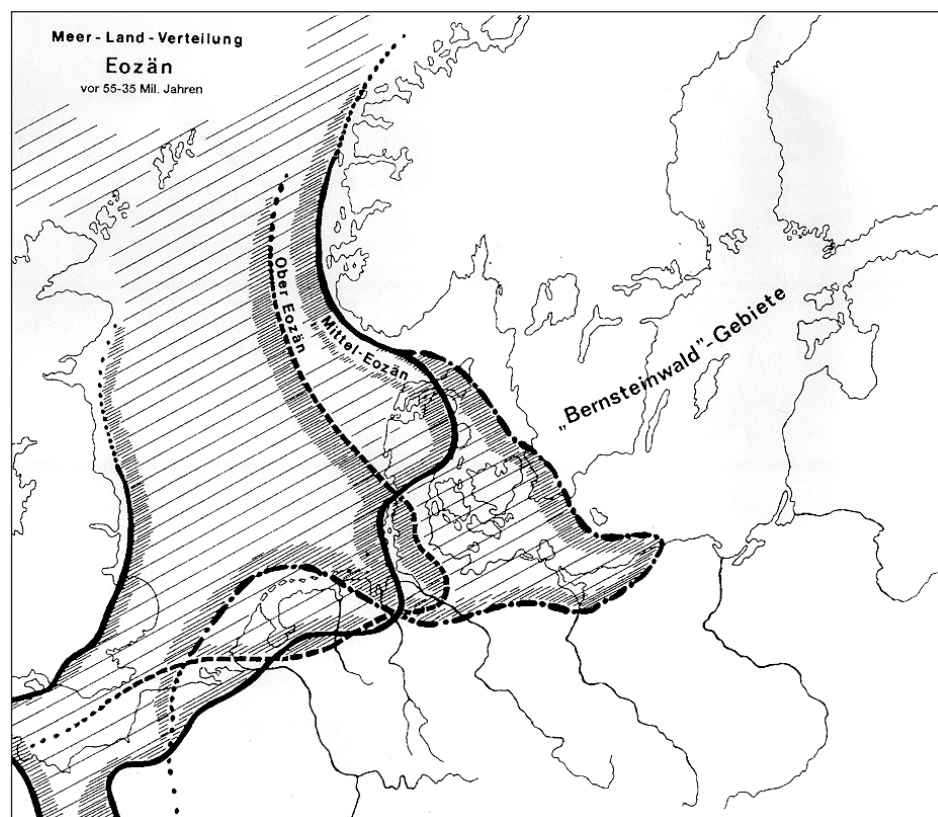
Epoche	Artenvielfalt	Besondere Ereignisse
Oberkreide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Angiospermen nehmen zu</li> <li>- übertreffen zum Ende hin die Artenvielfalt der Koniferen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- norddeutscher Raum vom Meer bedeckt [8]</li> <li>- deutliche Abkühlung</li> <li>- Wälder zeigten „ein charakteristisches modernes Aussehen“ [9]</li> </ul>
Paläozän		<ul style="list-style-type: none"> <li>- wechselndes Ausdehnungsgebiet der Ostsee</li> <li>- kühl- gemäßigt</li> <li>- plattentektonische Nordverschiebung um 10°</li> </ul>
Eozän	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bernsteinwald</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- subtropisch bis tropisch</li> </ul>
Oligozän	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tropischen Wälder gingen zurück, Laubwälder kamen [8]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- erneute Ausbreitung des Meeres im norddeutschen Raum</li> <li>- Klimaänderung, Rückgang der Niederschläge, beginnende Polvereisung [10]</li> </ul>

Das primäre Entstehungsgebiet des Bernsteinwaldes wird zur Zeit des Eozäns mit einem Verbreitungsgebiet zwischen 40° und 50° Paläobreite [10], ausgehend von Südkandinavien (Südschonen) über die norddeutsche Ebene (Rügen - Berlin) bis ins nördliche Rußland (Ural) vermutet (Abbildung 3) [11]. Es ist der einzige Zeitraum im Paläogen, in dem der nordosteuropäische Raum nicht von Wassermassen bedeckt war (Abbildung 2). Die genaue Lage und die Ausmaße dieses Waldgebietes sind ebenso unbekannt wie die harzabscheidenden Baumarten. Es wird vermutet, daß der Bernsteinwald während einer Zeitspanne von 15 bis 20 Millionen Jahren bestand [7].

Nach den gemäßigten kühleren Temperaturen des Paläozäns herrschten im Eozän bis nach Skandinavien subtropische bis tropische, warm-feuchte Bedingungen. Die Klimagrenzen waren im Vergleich zum heutigen Holozän wegen fehlender Polvereisungen auf der nördlichen Hemisphäre um mehr als 15 Breitengrade nach Norden verschoben [10]; es herrschte eine mittlere Jahrestemperatur von +20°C.



**Abb.2:** Norddeutscher Raum im Eozän [8]



**Abb. 3:** Lage des Bernsteinwaldes [19]

Im Alttertiär wuchsen im nordeuropäischen Raum üppige Urwälder: neben den Coniferen auch Ahorn, Eichen, Ulmen, Linden, Pappeln, Kastanien, Weiden, Ölbäume, Magnolien, Sumpfyypressen und Palmen [10, 12, 13, 14]. Diese Mischwälder bildeten den in der Literatur stets erwähnten "Bernsteinwald", den die Paleobotaniker H.R. Göppert und sein Schüler H. Conwentz im ausgehenden 19. Jahrhundert erstmals postulierten. Sie beriefen sich dabei auf Untersuchungen von schwärzlichen Holzüberresten im Baltischen Bernstein. Demzufolge sah Göppert in der Fichte die bernsteinerzeugende Baumart und klassifizierte diese mit dem lateinischen Namen *Pintes succinifer* [15]. Sein Schüler Conwentz vermochte dagegen nicht ausschließen, daß es sich bei den Holzüberresten auch um Kiefernholz handeln könnte, und änderte den Namen in *Pinus succinifera* um. Beide Botaniker schlossen allerdings die Existenz von Tanne und Lärche als Ursprungsbaumart für den Bernstein aus [16]. Weiterhin wurde ein krankhafter Harzfluß (Succinose) formuliert, der für die gesteigerte Harzproduktion verantwortlich sei. "Wird ein Wald wie der Bernsteinurwald auf dem nordischen Festland des Tertiärs sich selbst überlassen, so bleibt kaum ein Baum vollständig gesund: das Krankhafte wird zur Regel, das Normale zur Ausnahme." [13]

Conwentz nennt eine lange Liste mit den angreifenden Tieren auf die Bernsteinbäume, die mit "pathologischer Harzexkretion" als Folge dessen reagieren. Sie zeigt lediglich eine auch heutzutage mögliche Schädigung von Bäumen auf und erklärt nicht unbedingt eine "krankhafte Überproduktion" von Harzsekreten. Es darf nicht vergessen werden, daß die Harzproduktion für den Baltischen Bernstein auf eine Zeitspanne von 20 Millionen Jahren umrissen wird. Es ist kaum anzunehmen, daß das Harz in dieser Zeit lediglich auf einen einzigen Wald mit einer einzigen Baumart zurückzuführen ist. Neuere Untersuchungen zeigten Ähnlichkeiten zwischen dem Harz einer rezenten nordafrikanischen Zedernart (*Cedrus atlantica*) und dem Baltischen Bernstein auf [7]. Auch das Harz von *Agathis* (eine Kaurifichte) konnte im Baltischen Bernstein nachgewiesen werden. Diese Bäume sind als große Harzproduzenten bekannt [17]. Weiterhin konnte anhand von Modellrechnungen aufgezeigt werden, daß bei einer anzunehmenden Waldfläche von 40000 km<sup>2</sup> über einen Zeitraum von 10 Millionen Jahren etwa 10 kg Harz pro Jahr und Quadratkilometer ausreichen, um 4\*10<sup>9</sup> t Bernstein zu erzeugen [18].

Die produzierten Harzmengen mußten anschließend in den Waldboden unter anaerobe Bedingungen gelangen. Aus diesem wurden die Harze vermutlich schon im Unter- und Miozän durch große, saisonal bedingte Flüsse heraus-

gewaschen und ins Meer oder in Seen eingetragen. Durch neue tektonisch bedingte Hebungen fanden weitere Umlagerungen und Anreicherungen statt. Die Lagerstätten der südlichen Ostseeküste sind vermutlich so über den Eridanos-Fluß infolge von Auswaschungen und Sedimentation im Deltabereich des Flusses entstanden [11]. Heutzutage wird diese Sedimentationsschicht, die sich überwiegend im östlichen Europa befindet, als "Blaue Erde" bezeichnet, wofür Glaukonit, ein Eisen-Aluminium-Silikat, im tonigen Sand verantwortlich ist. Dieses verleiht dem Sediment eine bläuliche Farbe. Lithostratigraphische Untersuchungen datierten die unteren Schichten der Blauen Erde schon ins Mitteleozän, die mächtigsten Schichten ins Unteroligozän, welches ungefähr 35 Millionen Jahren entspricht. Paleobotanische Untersuchungen der Blauen Erde weisen neben einem hohen Anteil an Meeresphytoplankton einen höheren Anteil an Angiospermen als an Gymnospermen auf. Bei letzteren ist allerdings der Anteil an Pinuspollen dominierend [20].

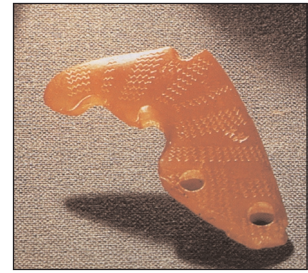
Weitere Umwälzungen erfolgten als Begleiterscheinungen der Interglazialen im nachfolgenden Pleistozän. Hier wurden neben den Granitblöcken und anderen Sedimenten auch Bernsteine erfaßt und gen Süden großräumig umgelagert. Die diluviale Vereisungsgrenze deckt sich mit den südlichen Vorkommen. Die im Holozän entstandenen Urstromtäler führten zu weiteren Transporten. Daher findet sich der Baltische Bernstein heutzutage über das gesamte Ostseegebiet verteilt an. Wieviele Umlagerungen es bis in die heutige Zeit gab, wird nur schwer zu rekonstruieren sein. Die bislang größte rezente Anreicherung von Baltischem Bernstein konnte in Polen festgestellt werden.

## 1.2 Historischer Überblick

Schon in der Steinzeit wurde von den Menschen Bernstein bearbeitet [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. Die ältesten Funde, meist Tierplastiken, stammen aus dem Jungpaläolithikum, der Federmesserkultur, die in einen Zeitraum von ca. 12000 bis 11000 BC datiert wird. Eine größere Anhäufung von Bernsteinfunden findet sich im Mesolithikum (8000 - 5000 BC). Es wurden nicht nur Tierfiguren sondern auch die ersten Bernsteinplastiken in Menschenform aufgefunden. Der Bernstein schien nun eine bedeutendere Rolle zu spielen, da viele Fundstücke Löcher aufweisen, die auf eine Verwendung als Amulett hinweisen. Ein beson-



ders schönes Stück ist zum Beispiel ein Elchkopf aus Egemark, Dänemark, von 7,5 cm Länge (Ertebölle/ Ellerbeck-Kultur). In einem der beiden bikonischen Löcher wird ein Seilschliff gedeutet. Der Elchkopf könnte als Anhänger oder als Applikation getragen worden sein (Abbildung 4). Insgesamt überwiegen bei den Funden die Darstellungen von Jagdtieren, eine Funktion



**Abb.4:** Elchkopf [21]

als Glücksbringer bei der Jagd ist daher nicht auszuschließen. Magische Vorstellungen über Heil- und Zauberkräfte lassen sich beim Bernstein neben der Verwendung als Schmuckstück über die Jahrtausende nur schwer voneinander trennen. Im Neolithikum kommt als weiterer Faktor der Symbolstatus des Wohlstandes hinzu. Von den drei Zentren der Bernsteingewinnung an der lettischen Küste und Jütland aus verbreiten sich mit der Megalithkultur (5000 - 2000 BC) Rohlinge und bearbeitete Bernsteine in Form von Perlen nach Nord- und Mitteleuropa, wie zahlreiche Funde aus neolithischen Gräbern zeigen.

Mit Beginn der Bronzezeit (2000 - 800 BC) zeichnen sich über die böhmische Aunjetitzer-Kultur Bernsteinhandelswege ab. Diese folgen, von Jütland ausgehend, der Elbe nach Süden zu Wegegabelungen Richtung Saale, Bayern, Alpenpaßwegen gen Süden oder Richtung Moldau (Böhmen). Ein anderer folgte möglicherweise einem schon bekannten Handelsweg, beginnend von der Eidermündung über die Elbe, Paderborn bis Duisburg und den Rhein abwärts bis nach Frankreich. Für die frühe Eisenzeit wird ein weiterer Handelsweg über die untere Weichsel, Posen, Schlesien zur Donau und von dort weiter Richtung Adria diskutiert [23]. Diese weitreichenden Handelswege führten bis in die Ägäis, wie die Funde von skandinavischen Bernsteinperlen von 1600 BC in den Gräbern von Mykene zeigen. Möglicherweise wurde von Mykene aus der Bernstein weiter in den Vorderen Orient, Kreta oder Sizilien verhandelt.

Ein anderer Markt für den Baltischen Bernstein fand sich während der Bronzezeit in der südenglischen Wessex-Kultur, die außer mit Gold und Zinn auch mit Bernstein handelte. In ihren Gräbern konnten zahlreiche Bernsteinartefakte geborgen werden, die nicht nur aus Schmuckstücken wie Perlen sondern auch aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen wie Bernsteinschieber, konischen Knöpfen oder Tassen bestanden. Weiterhin konnten Fernhandelsbeziehungen zwischen der Wessex-Kultur und der mykenischen über die Bernsteinschieber nachgewiesen werden. Die griechische Kolonisation und der etruskische Handel führten während der Hallstattzeit (1200 - 600 BC) zu einer weiteren Ausbreitung dieses Materials. Für diese Zeitepoche

und für die anschließenden La Tènezeit können jedoch keine genauen Herkunftsaussagen mehr getroffen werden. Bei dem großen Bedarf an Bernstein könnte hier neben dem Baltischen Bernstein auch sizilianischer vorliegen.

Es wird angenommen, daß der Baltische Bernstein über die großen Handelsplätze Hallstatt und Dürnberg bei Hallein im verstärkten Maße über die Osthandelsroute seinen Weg in den Süden fand. Als Gegenleistung könnte neben Metall vor allem Salz Richtung Norden getauscht worden sein. Von Hallein aus ging es vermutlich einerseits in das Hinterland der nordöstlichen Adriaküste, andererseits unter Aussparung von Venetien nach Picenum und ins übrige Italien. Zentren der Bernsteinverarbeitung waren Vetulonia in Etrurien und die griechischen Städte Kampaniens und Apuliens. Von Italien aus gelangen vermutlich die fertigen Produkte wieder über die Alpen nach Nord- und Mitteleuropa. Gesichert ist die zunehmend kostbarere Ausstattung der Gräber, wie zum Beispiel die der Fürstengräber von Vix, Reinheim und Hohenmichele. In der zweiten Hälfte des 1. Jahrhunderts BC verliert der Bernstein bei den Kelten an Bedeutung. Eine Ursache könnte der tiefgreifende wirtschaftliche Einschnitt infolge der römischen Expansionen sein, eine andere ist das geringe Artefaktvorkommen aus den nordeuropäischen Gräbern der späten La Tène-Zeit und der frühen römischen Kaiserzeit als eine Folge der wieder zunehmenden Brandbestattungen.

Die Bedeutung des Bernsteins als Exportgut ist dagegen von Plinius (23/24 - 79 AD) in seiner *Naturalis historiae*, Buch XXXVII zur Zeit Neros schriftlich belegt<sup>[28]</sup>. In der römischen Antike gewann besonders zur Kaiserzeit unter Vespasian bis Hadrian der Bernstein wieder an Bedeutung. Während der Völkerwanderungszeit (345 - 600 AD) übernahmen die aus dem Weichselgebiet stammenden Goten den Bernsteinhandel im Samland und an der russischen Ostseeküste. Die Handelsbeziehungen verliefen nun über die an der Weichsel verblieben gotischen Stämme bis nach Italien. Von dem Politiker Cassiodorus (ca. 490 - 580/90 AD) sind aus seinen schriftlichen Quellen (A. Cassiodorus, *Varial* V, 2) Rohbernsteinlieferungen über diesen Weg nach Ravenna bekannt<sup>[26, 29]</sup>. Im frühen Mittelalter nimmt die Anzahl der Bernsteinfunde aus bislang ungeklärten Gründen wieder ab. Eine mögliche Ursache könnte das Vordringen der Slawen aus dem Dnjeprgebiet bis an die Elbe sein. Die Slawen herrschten somit über das gesamte östliche und norddeutsche Ostseegebiet, wobei sie statt des Bernsteins Silber und Glas als Schmuckmaterial bevorzugten. Über den Handel und Verwendung von Bernstein zur Wikingerzeit ist ebenfalls wenig

bekannt.

Dagegen ist aus schriftlichen Quellen des Mittelalters die Bedeutung und Verwendung des Bernsteins in der Medizin überliefert. Schon bei Plinius wird der Bernsteinschmuck als Heilmittel gegen geschwollene Mandeln, Halserkrankungen und Fieber erwähnt. Als Trank helfe er in jedem Alter gegen Wahnsinn, Magen- und Harnbeschwerden. Mit Honig zerrieben heilt er Blindheit und durch den Zusatz von Rosenöl auch Ohrenkrankheiten. Im Mittelalter zählte der Bernstein zu den 6 wichtigsten Medikamenten wie folgender überlieferter Hexameter zeigt:

"Sunt sex in medicis, quæ vincunt robore taurum,  
succinum, castoreum, mars, camphora tartus et aurum" [30].

In Hildegard von Bingens (1098-1179) Buch "Physica" sind Rezepte für die Behandlung mit Bernstein gegen Magen- und Harnbeschwerden erhalten.

Mit der Ausbreitung des Deutschen Ritterordens im baltischen Ostseeraum wuchs wieder die Bedeutung des Bernsteins im wirtschaftlichen Interesse. So führte 1264 der Deutsche Ritterorden das sogenannte "Bernstein-Regal" ein, welches ein Alleinrecht zur Gewinnung und des Handels mit dem Baltischen Bernsteins zugunsten des Ritterordens vorsah. Demnach mußte jedes Stück Bernstein, welches am Strand aufgelesen wurde, abgegeben werden. Es entstanden die ersten Bernsteindreherzünfte in Brügge (1302) und Lübeck (1310). Weitere Innungen folgten in Stolp, Kolberg und Danzig. Die Königsberger Bernsteindreherzunft wurde sogar erst 1641 zugelassen. Bis 1899 befand sich das Regal in den Händen des Ritterordens und fiel danach an die preußischen Kurfürsten, die es an Kaufmannsfamilien verpachteten. Für diese Zeitepoche bis ins 17. Jahrhundert mehren sich auch die im Mittelalter noch spärlichen schriftlichen Rezepte über die Verwendung von Bernstein, Bernsteinsäure und -öl gegen Krankheiten. So beschreibt Agricola in seinem Werk "De natura fossilium" (1554) die Möglichkeit über Trockendestillation Bernsteinsäure und -öl zu gewinnen. Diese beiden Wirkstoffe ergäben, wie auch das bernsteinsäurehaltige Ammoniak (*Ammonium succinum*), nervenstärkende und krampfstillende Arzneimittel. 1654 pries J. Allen in seinem "Dispensatory" die Wirkung gegen Kopfschmerzen, Husten, Tuberkulose und Nasenbluten. Hingegen wußte Matthäus Praetorius 1680 den pulverisierten Bernstein als Mittel gegen



Wundstarrkrampf und Pest zu würdigen. Versetzt mit Baumöl solle er Brandwunden lindern, und Amulette böten einen sicheren Schutz gegen Gift, Zauber und Fieber.

Einen künstlerischen Aufschwung erlebte der Bernstein im 17. Jahrhundert. Über die beginnenden großen Sammlungen an den Königs- und Fürstenhöfen verbreitete sich die Nachfrage an Gegenständen aus Bernstein jeglicher Art bis ins wohlhabende Großbürgertum. Eine der bekanntesten Arbeiten während dieser künstlerischen Hochphase der Bernsteinbearbeitung im deutschen Gebiet ist das "Bernsteinzimmer", welches Friedrich Wilhelm I 1716 Zar Peter dem Großen schenkte. Im 19. Jahrhundert ging die künstlerische Bedeutung zurück. Das Bernsteinregal ging 1899 in die Firma Stantien und Becker über. 1907 wurden die Staatlichen Bernsteinwerke Königsberg gegründet, die 1924 von der Preussag AG übernommen wurden. Bis 1945 hatte das Dritte Reich das Weltmonopol für den Bernsteinhandel.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde Bernstein wegen seiner Nichtleiter-Eigenschaft als Isoliermaterial in Kondensatoren und Spektroskopen eingesetzt. Aufgrund seiner chemischen Inertheit gegen Flußsäure wurde Preßbernstein in Form von Tiegeln, Kolben, Schalen, Rührstäben und Reagenzgläsern anstelle des teureren Platins in den 30er Jahren in den Handel gebracht <sup>[31]</sup>. Zeitgleich meldete H. Lampert beim deutschen Patentamt die Verwendung von Preßbernstein für medizinische Geräte, zum Beispiel für Bluttransfusionsgeräte, an. Zu diesem Zeitpunkt stellte die Blutgerinnung bei der Bluttransfusion in der Medizintechnik ein großes Problem dar, welches durch hemmende Zusatzmittel, wie dem aus Blutegeln stammenden Hirudin oder dem körpereigenen Heparin, oder eine kurze Übertragungszeit umgangen werden mußte. Die Übertragung fand entweder direkt statt, indem die Arterie des Spenders mit der Vene des Empfängers chirurgisch miteinander vernäht wurde, oder über Glasbüretten, die von innen mit gerinnungsverzögerndem Paraffin stets neu beschichtet worden waren. Gefahren bestanden darin, daß sich während der Transfusion das Paraffin löste, in den Blutkreislauf eingeschwemmt wurde und Embolien verursachte. Lampert konnte dagegen beim Bernstein eine besonders langsame Gerinnungszeit im Vergleich zu Glas feststellen. Auf eine Paraffinierung der Bernsteintransfusionsgeräte konnte demnach verzichtet werden. Solche Geräte wurden als Feldtransfusionsapparate im 2. Weltkrieg eingesetzt. Danach verschwanden sie wie auch die Laboratoriumsgeräte durch die zunehmend verbesserte Medizin- und Labortechnik aus dem Handel.

## 1.3 Forschungsstand

Die ältesten schriftlichen Erwähnungen über das “Gold des Nordens” finden sich in der griechischen Mythologie. Eine detaillierte Übersicht zahlreicher griechischer und römischer Autoren hierzu liefert Plinius in seinem erwähnten Werk “Naturalis historia, Buch XXXVII”. Hierbei ist neben der geographischen Herkunft vor allem der Ursprung und seine Klassifikation Gegenstand dieser Quellen. Dabei wurden bis in die Neuzeit viele Irrtümer publiziert [14, 29]. Eine Auswahl davon ist in der Tabelle 2 aufgelistet.

**Tab. 2:** Beispiele für Irrtümer zum Thema Bernstein

Jahr	Urheber	Bezeichnung
480 - 460 BC	Euripides	Schwester des Phaetos: ihre Tränen werden zu Bernstein
23/24 - 79 AD	Plinius	herabfließendes Mark der Bäume der Gattung Fichten, verdickt sich durch Kälte, Meer und Zeit
1554	Agricola	De re metallica, libri XII: Bergwachs
16. Jahrhundert	unbekannt	mineralisches, bituminöses Erzeugnis aus der Gruppe Erdöl; Petroleum ist verflüssigter Bernstein
1677	P. Hartmann	Succini prussici Physica et Civilis Historia: Edelstein
1767	F. E. Bock	versteinerte Pflanzen

Erst im 1757 konnte der Russe Lomonossow die Wissenschaftler vom organischen Ursprung des Baumharzes überzeugen. Danach änderte sich der Forschungsschwerpunkt. Stand im ausgehenden 19. Jahrhundert mehr die Frage nach der Taxonomie im Vordergrund, so wendete sich die Forschung bald schon den Inkluden zu, um anhand dieser die Flora und Fauna zu ergründen. Erste chemische Analysen führte Agricola 1544 mit Trockendestillationen durch [31]. Er fand als charakteristischen Inhaltsstoff die Bernsteinsäure und löste eine bislang nicht geklärte Diskussion aus, in welcher Form die Bernsteinsäure im Polymer vorliegt. Die Spekulationen reichen von der Anhydridform über Ester bis hin zu der Vermutung, daß die Bernsteinsäure lediglich ein Diageneseprodukt sei, die weniger den Ursprung als das Alter anzeigt [32]. Wegen seines hohen Anteils an Bernsteinsäure erhielt der Baltische Bernstein auch den Namen Succinit.

Weitere Bernsteinvorkommen wurden entdeckt und benannt (Tabelle 3):

**Tab. 3:** Bernsteinvorkommen

Herkunft	Entdeckung	Bezeichnung
Rumänischer B.	1788 Raicewich	Romanit
Libanesischer B.	1843 Russeger	
Burmesischer B.	1851 Kooger	Burmit
Dominikanischer B.	Columbus	
Mexikanischer B.	1889/90 Kunz	Chemawinit
Kanadischer B.	1891 Harrington	

Heutzutage sind über 100 fossile Harze bekannt, die zum Teil als rezensorische Harze neben den Bernsteinen vorkommen. Die meisten dieser Vorkommen liegen in Europa.

Im Jahre 1829 fanden weitere chemische Versuche durch Berzelius statt. Er beschrieb, daß sich der Bernstein in einen löslichen und einen unlöslichen Anteil zerlegen läßt. Die Isolierung von Borneol (**1**) 1860 wies erstmals auf den terpenoiden Charakter des Polymers hin. Mit der technischen Entwicklung der Analysengeräte nahm die Anzahl der Forschungen an diesem Material zu [33]. Dabei konzentrierten sich die analytischen Untersuchungen auf den löslichen Anteil. So kamen 1890 Tschirch und Aweng de Jong zu folgender Zusammensetzung [34, 35]:

28% Succinoabietinsäure (eine Harzsäure, die sie so benannten, ohne sie weiter zu beschreiben)

12% Succinoabietinol

7,8 % Succinoresen

6-8% Borneol

4% Bernsteinsäure

4% Borneolester

65% Bernsteinsäureester

Ihre Elementaranalysen wiesen einen Kohlenstoffgehalt von 79%, einen Wasserstoffanteil von 10,5% und einen Gehalt an Sauerstoff von 10,5% auf. Der Schwerpunkt der meisten nachfolgenden wissenschaftlichen Arbeiten liegt jedoch nicht mehr in der Strukturaufklärung, sondern in der Suche nach charakteristischen Unterscheidungsmerkmalen, sogenannten Fingerprints oder Geomarkern, der verschiedenen Bernsteinspezifitäten. Dies ist besonders für die Frage nach der Herkunft einzelner archäologischer Artefakte interessant, um Handelsrouten rekonstruieren zu können. Die dabei angewandten apparativen Techniken sind vor allem die Infrarotspektroskopie, die Festkörper-NMR-Technik

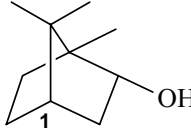
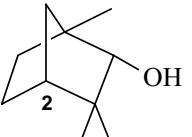
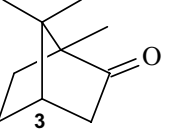
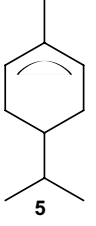
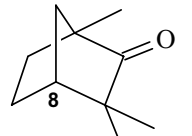
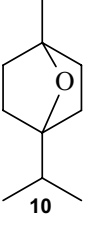
und die Pyrolyse-Gaschromatographie. So konnte Beck [36, 37, 38] mit seiner Arbeitsgruppe zwischen 1964 und 1971 mit Hilfe der Infrarotspektroskopie beim Baltischen Bernstein eine "charakteristische Schulter" in einem Wellenlängenbereich von 1160 bis 1150  $\text{cm}^{-1}$  nach 2 scharfen Banden zwischen 1250 bis 1175  $\text{cm}^{-1}$  feststellen. Eine vollständige Interpretation der Spektren hinsichtlich der Zuordnung funktioneller Gruppen liegt dagegen in der vorliegenden Literatur nicht vor. Kritik gegen diesen Fingerprintbereich wurde zeitgleich von Savkevich [39, 40] geäußert. Nach dessen Meinung zeigen auch andere in Nordeuropa vorkommende fossile Harze und Bernsteine wie der Beckerit, Gedanit oder Ukrainischer Bernstein diese charakteristische Schulter. Eine Unterscheidung der nordeuropäischen fossilen Harze aus dem Ostseeraum sei somit nicht möglich. Für die Abgrenzung des Succinitis vom sizilianischen Bernstein oder von weiter regional entfernt liegenden fossilen Harzen ist dagegen die Infrarotspektroskopie ein geeignetes Verfahren.

Ein weiteres Verfahren zur Herkunftsbestimmung ist die Untersuchung von Bernsteinproben mit Festkörper-NMR-Methoden. Derartige Untersuchungen wurden hauptsächlich von der Arbeitsgruppe Lambert für den Dominikanischen Bernstein durchgeführt [42, 43]. Eine Interpretation der Spektren hinsichtlich der Struktur ist mit diesem Verfahren jedoch nicht möglich.

Solche Informationen können durch den Einsatz der Pyrolyse-Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie gewonnen werden. Bislang wurde im wesentlichen nur die Pyrolyse-Gaschromatographie angewendet [44].

Nach dem jetzigen Forschungsstand sind mehrere Monoterpene aus dem Bernstein bekannt (Tabelle 4) [45, 46, 47]. Weiterhin konnten Bernsteinsäure-ester (siehe Kapitel 5.6) und einige diterpenoide Harzsäuren des Abietan- und Pimarantyps (siehe Kapitel 3.2.3) als Inhaltsstoffe identifiziert werden [48]. Das Vorkommen dieser Harzsäuren ist aus der Forschung über rezente Harze bekannt. Weitere Substanzen aus dem löslichen Anteil sind bislang nicht identifiziert.

**Tab. 4:** Monoterpene im Bernstein

Nr.	Name	
1	Borneol	
2	Fenchol	
3	Campher	
4	Camphen	
5	para-Cumol	
6	Terpinol	
7	Carvomentan	
8	Fenchon	
9	Bornylformiat	
10	Cineol / Eucalyptol	

In einigen Arbeiten <sup>[49]</sup> konnten über Elementaranalysen die Anwesenheit von Schwefel mit einem Anteil von ca. 1% festgestellt werden, woraus Disulfidbrücken als bindende Elemente im Polymer postuliert wurden. Bei der Reduktion des löslichen Bernsteinanteils mit Thioglycolsäure wurden neben der Dehydroabietinsäure (siehe Kapitel 3.2.3) Alkane und Fettsäuren festgestellt. Unklarheiten über die Matrix und die Substanzen bestehen auch bei dem unlöslichen Anteil. Seit den letzten 20 Jahren liegen zwei Hypothesen vor, die beide stark umstritten sind:

### 1. Die Diabietinsäure- Hypothese

Die Hypothese, daß das grundlegende Gerüst des Bernsteins aus einem Abietinsäurepolymer gebildet wird, hat Rottländer 1971 formuliert. Da seiner Meinung nach die taxonomischen Bäume des Baltischen Bernsteins Kiefern waren und ihre entscheidene Hauptkomponente die Abietinsäure ist, ist demzufolge das Polymer aus einem Abietinsäurederivat aufgebaut. Er postulierte dazu vier Stufen <sup>[50, 51, 52]</sup>:

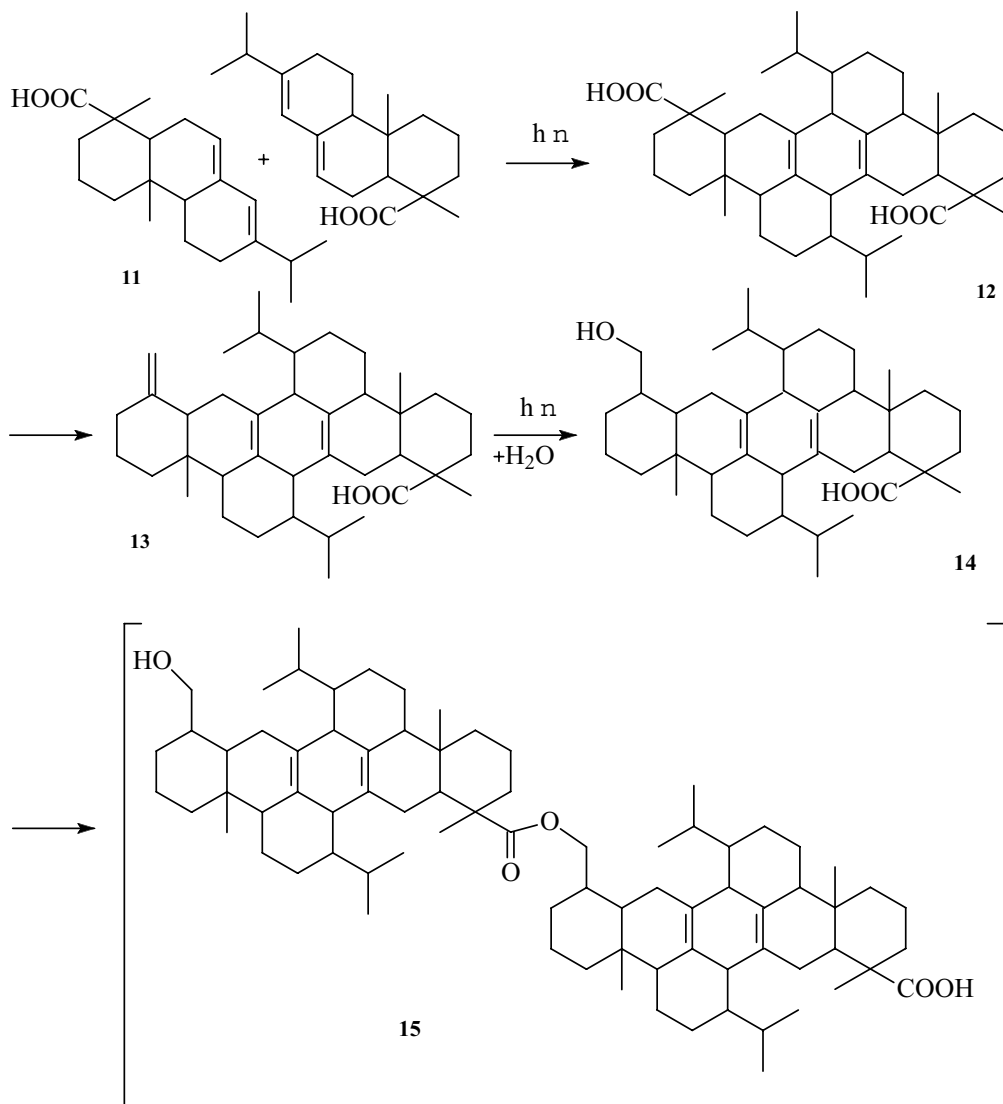
Stufe 1: Die Abietinsäure (**11**) dimerisiert zu einen heptacyclischen Dimer (**12**), der Diabietinsäure.

Stufe 2: Eine der beiden Carboxylgruppen wird deformyliert. Es entsteht Diabietensäure mit einer exocyclischen Methylengruppe (**13**).

Stufe 3: An diese exocyclische Doppelbindung wird in einer Anti-Markovnikov-Reaktion Wasser addiert, so daß eine freie primäre Hydroxygruppe (**14**) -

Diabietinolsäure - gebildet wird.

Stufe 4: Über eine Kondensation der Hydroxygruppe eines Moleküls mit der Carboxylgruppe eines weiteren dimeren Moleküls entsteht über eine Esterfunktion das Polymer (**15**):



Die Kritik an dieser Hypothese umfaßt mehrere Punkte:

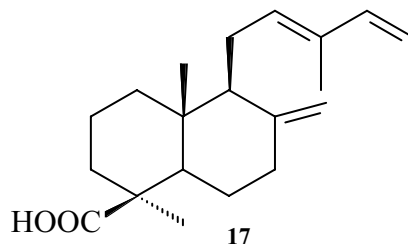
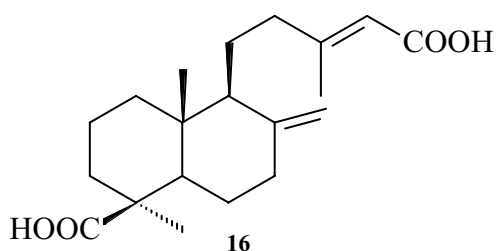
1. Abietinsäure dimerisiert unter extremen künstlichen Bedingungen (mit Lewissäuren wie  $BF_3$ ) [38]. Eine Isolation aus Naturstoffen ist bislang nicht bekannt.
2. Photochemische Studien zeigen, daß Carboxylgruppen unter UV-photochemischen Bedingungen bevorzugt zur Decarboxylierung neigen [38].

3. Rottländer liefert keine Erklärung, warum nur eine Carboxylgruppe reduziert und die zweite, chemisch äquivalente, nicht angegriffen wird.
4. Eine einfache Addition von Wasser an eine Doppelbindung besonders nach Anti-Markovnikov ist unwahrscheinlich. In der Regel entstehen solche Produkte als Ergebnis einer Hydroborierung oder einer radikalischen Addition beispielsweise von Hydrogenbromid <sup>[53]</sup>. Beides ist unter natürlichen Bedingungen nicht unbedingt vorauszusetzen.
5. Eine Modellstruktur für Rottländers Diabetinolsäure, Cyclohexylmethyl-1-cyclohexancarboxylat <sup>[38]</sup> zeigte im Infrarotspektrum deutlich andere Banden als sie für den Baltischen Bernstein bekannt sind.
6. Rottländer führte die Versuche mit Kolophonium durch. Versuche unter gleichen Bedingungen mit reiner Abietinsäure wurden zur Unterstützung seiner Hypothese nicht durchgeführt. Ebenso liegen nur seine Massenspektren mit einem Massenpeak von 604 als Diabetinsäure vor. Eine kernresonanzspektroskopische Messung zur eindeutigen Strukturidentifizierung ist dagegen nicht publiziert.

## 2. Die Labdan-Hypothese

Gough und Mills <sup>[47, 54, 55]</sup> wiesen in einer mit Ether extrahierten Lösung Agathicsäure (**16**), ein Labdanderivat, nach. Desweiteren stellten sie ein Verhältnis von 75-83 % Labdane zu nur 15-21 % Pimarane und 1.5-4 % Abietanderivate im Bernstein auf. Demzufolge würde das Polymer aus Labdanen wie die Agathicsäure oder Cumminsäure (**17**) gebildet werden. Wie dieses Polymer im Einzelnen aussehen soll, wurde von Gough und Mills nicht publiziert.

Dagegen spricht, daß andere Arbeiten <sup>[45, 56]</sup> ein deutlich anderes Verhältnis der Harzsäuren und ihrer Derivate zueinander zeigen. Hier überwiegen deutlich die Komponenten der Abietinsäure und Pimaransäure.



## 2 Themenstellung

Die Paleobotanik ist daran interessiert, über die Inhaltsstoffe des Bernsteins auf die ursprünglichen bernsteinbildenden Bäume zu schließen. Hierzu ist es notwendig, den Polymerisierungsprozeß zu kennen. Dies ist aber nur bei Kenntnis der Inhaltsstoffe möglich. Die bislang in der Vergangenheit durchgeführten Analysen reichen dazu nicht aus. Das Material Bernstein bietet mit seiner geringen Dichte, Schwerlöslichkeit und seiner großen chemischen Beständigkeit gegen organische Lösungsmittel sowie Säuren und Laugen vielfältige Nutzungsmöglichkeiten. Um es für die Materialwissenschaften zugänglich zu machen, ist eine genaue Kenntnis seiner Struktur und Inhaltsstoffe nötig.

Neue Möglichkeiten, sich dem "Bernsteinproblem" zu nähern, sind durch den Fortschritt der Analystechnik gegeben. Immer genauere Meßverfahren ermöglichen die Untersuchung geringer Mengen. Hochauflösende Kernresonanzspektroskopie ermöglicht bessere Interpretationsmöglichkeiten in der Strukturaufklärung.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, geeignete Analysenverfahren für eine umfangreiche Erfassung der chemischen Bestandteile des Bernsteins zu finden. Dieses soll durch einen Vergleich verschiedener analytischer Methoden wie Gaschromatographie, Säulenchromatographie, HPLC, NMR und Massenspektrometrie erreicht werden. Dabei sollen soweit es die Methoden ermöglichen, Strukturen identifiziert werden.

Mittels der Pyrolyse-Massenspektrometrie sollen Unterschiede zwischen den Verwitterungskrusten und dem Inneren des Bernsteins aufgezeigt werden. Außerdem soll untersucht werden, ob sich durch die Ergebnisse der Pyrolyse Hinweise auf die Struktur des polymeren Anteils des Bernsteins erhalten lassen. Dabei werden nur Proben des Baltischen Bernsteins analysiert, um standardisiertes Untersuchungsmaterial zu verwenden.



### 3 Analytische Methoden

Aussagen und Ergebnisse analytischer Untersuchungen werden durch die verwendeten analytischen Verfahren determiniert. Hierbei bestimmen die chemischen Charakteristika der Analytik Erfäßbarkeit und bestimmbare Konzentrationen und somit indirekt die Wahl der Analyseverfahren. Für eine möglichst umfangreiche und stoffklassenunspezifische Analyse werden Methoden benötigt, die eine hohe Selektivität bei der Abtrennung von der Matrix, eine geringe Diskriminierung bei der Probenaufbereitung und der instrumentellen Messung bei kurzen Analysenzeiten gewährleisten, damit ein hoher Informationswert erhalten wird. Für die Bearbeitung der Bernsteinproben wurden verschiedene Analysenmethoden angewandt (siehe Abbildung 5). Diese können in folgende Schritte unterteilt werden:

1. Um einen Einblick in die gesamte Matrix zu erhalten, werden die Proben mit einem Festkörper-Pyrolysator / GC-MSD-Kombination analysiert.
2. Auftrennung der Matrix durch photochemische Degradation und Extraktion mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polarität.

Obwohl die Anwendung der folgenden Verfahren über ein breites Substanzspektrum informiert, sind den einzelnen Methoden Grenzen gesetzt. So kann der Bernstein im allgemeinen nicht völlig aufgelöst werden, so daß nur ein Teil analysiert werden kann. Die nachfolgenden Schritte beziehen sich auf den löslichen Anteil des Bernsteins:

3. Aufteilung und Fraktionierung des Probenmaterials:
  - (a) mittels HPLC
  - (b) an Sephadex
  - (c) an aktiviertem Kieselgel
  - (d) an mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel
4. Teilweise Derivatisierung der Fraktionen zur Einschränkung chromatographischer Diskriminierung von polaren Verbindungen.
5. Qualitative Analyse durch gaschromatographische und gaschromatographisch-massenspektrometrische Meßverfahren.
6. Strukturaufklärung mittels NMR.
7. Parallel dazu werden Vergleichsexperimente mit reinem Kiefernharz durchgeführt.

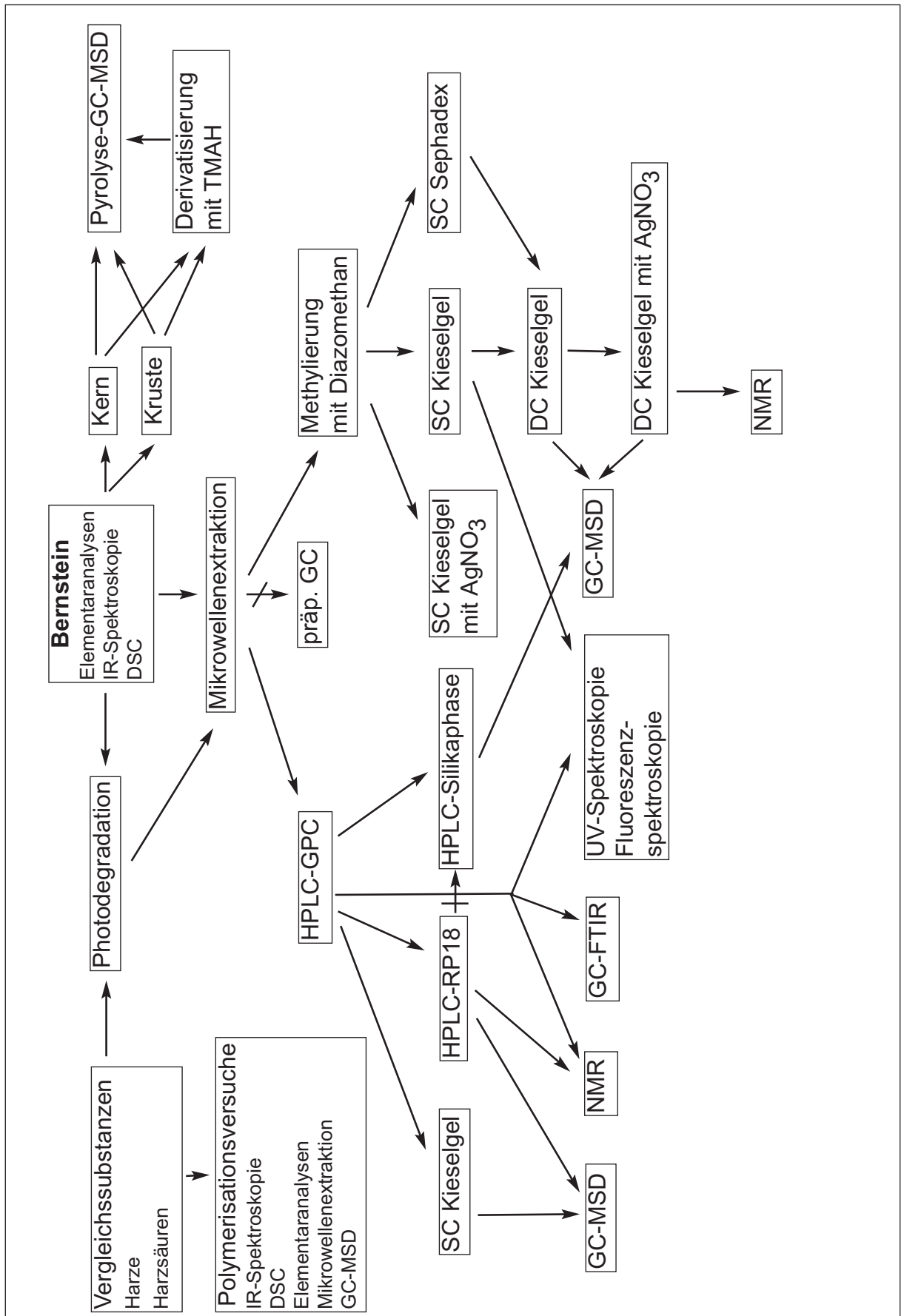


Abb. 5: Fließschema der angewendeten Methoden

## 3.1 Direkte Analyse von Bernstein

### 3.1.1 Pyrolyse

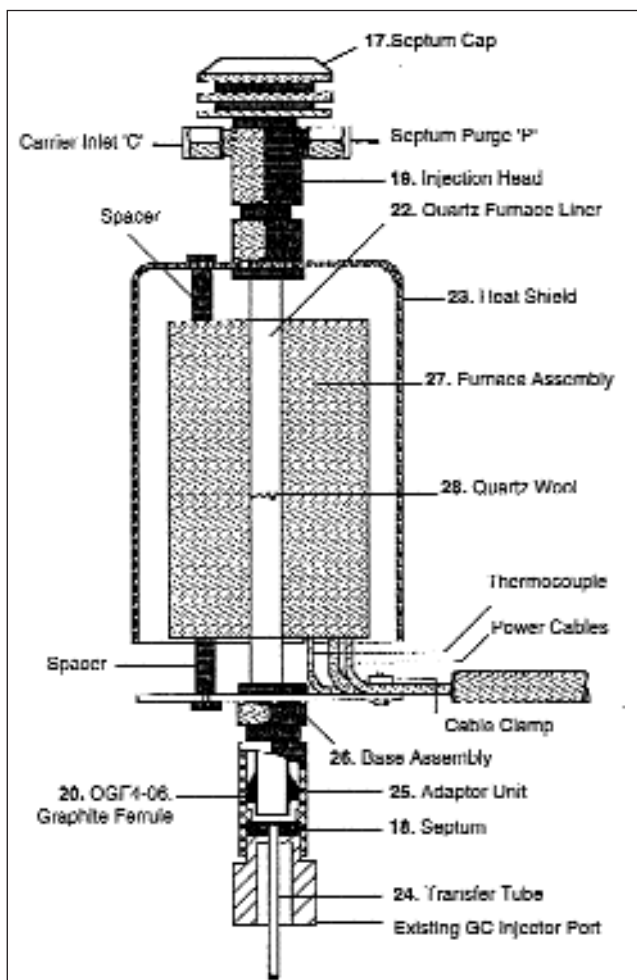
Als Pyrolyse wird die thermische Zersetzung von Substanzen bei Temperaturen über 300°C unter Ausschluß von Sauerstoff verstanden. Bei Temperaturen zwischen 100 und 300°C wird von einer thermalen Degradation gesprochen. Bei beiden Prozessen werden thermisch instabile Bindungen aufgebrochen [57]. Als Folge davon können große, in organischen Lösungsmitteln nur sehr schwer lösliche Makromoleküle zu kleineren, bestimmbarer Pyrolyseprodukten abgebaut werden. Während des Pyrolyseprozesses finden zahlreiche Strukturumwandlungen statt. Ziel der analytischen Pyrolyse ist es daher, in Kombination mit der Massenspektrometrie diese Abbauprodukte zu identifizieren und Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Matrix zu ziehen. Dabei wird angenommen, daß die bei der Pyrolyse entstehenden kürzeren Komponenten wesentliche Charakteristika der chemischen Struktur des Polymers beibehalten [58], bzw. der Bindungsbruch an den die Polymerisierung auslösenden funktionellen Gruppen stattfindet (*random cleavage*) [57].

#### 3.1.1.1 Pyrolyse-Geräte

Der Pyrolyseprozeß ist durch geringe Probenmengen, hohe Pyrolysetemperaturen (zwischen 400°C und 900°C), eine schnelle Aufheizrate und eine kurze Verweildauer im Pyrolyseofen gekennzeichnet [58, 59].

Dazu können verschiedene Geräte verwendet werden, zum Beispiel Curie-Punkt-Pyrolysatoren. Hierbei wird die Probe auf einen ferromagnetischen Draht aufgebracht, welcher in einem Hochfrequenzfeld induktiv erhitzt wird. Wird eine bestimmte Temperatur am Curie-Punkt erreicht, geht das ferromagnetische Material in einen paramagnetischen Zustand über. Die Energiezufuhr verringert sich, und die Temperatur bleibt konstant. Je nach Beschaffenheit des Probenhalters und der Feldstärke werden kurze Aufheizraten und eine gute Reproduzierbarkeit der Pyrolysetemperatur erreicht.

Ein anderer Gerätetyp ist ein Pyrolyseofen mit einer Widerstandsheizung. Hierbei erhitzt ein durch die Entladung eines Kondensators entstehender Stromstoß einen Platindraht, der über eine Brückenschaltung gleichzeitig zur



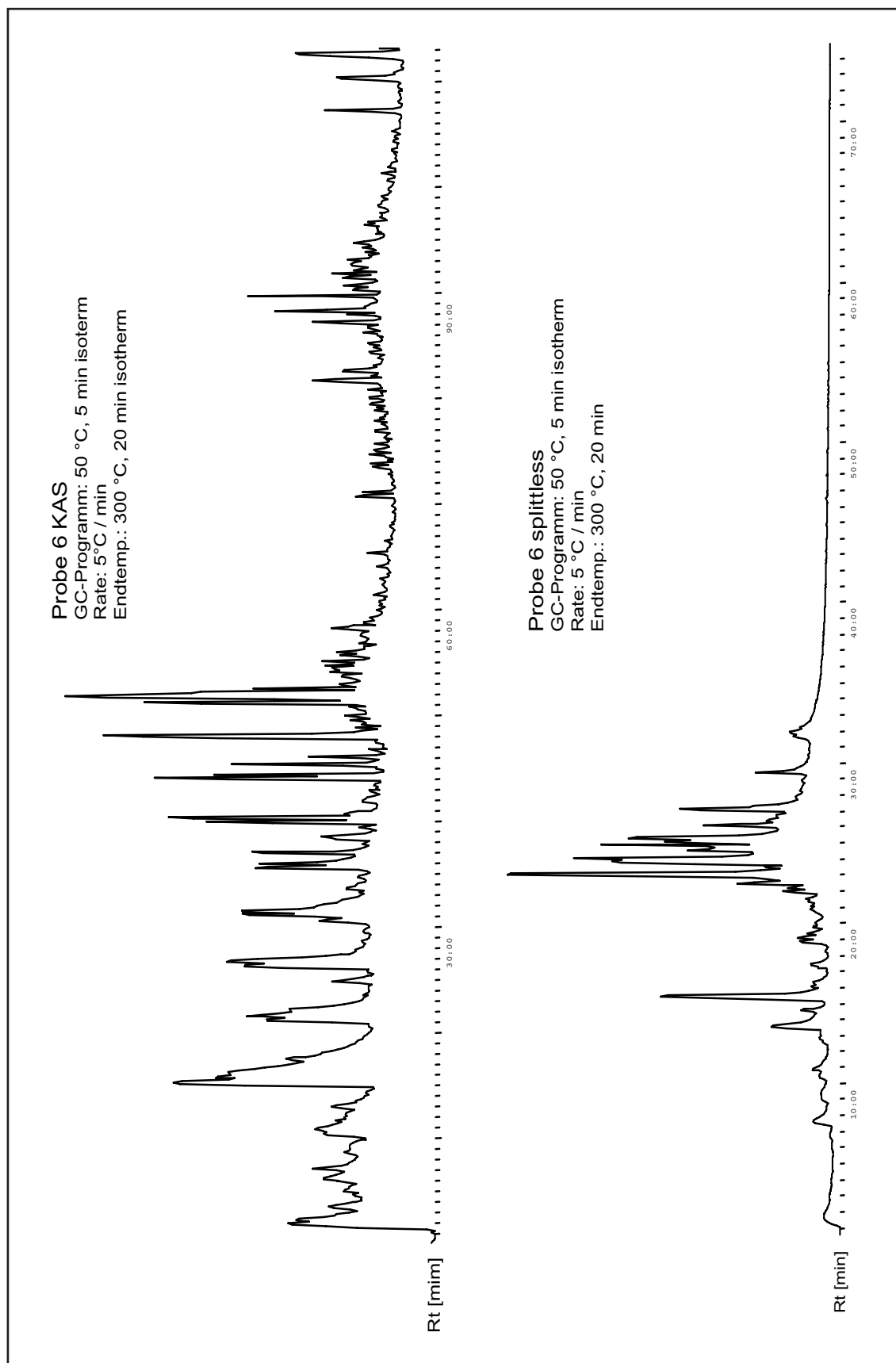
**Abb. 6:** Schematischer Aufbau des Pyrojectors<sup>[60]</sup>

Temperaturmessung dient. Über ein Steuergerät können die Aufheizraten und die Temperatur kontrolliert und im Vergleich zu den Curie-Punkt-Geräten einfacher variiert werden. Beide Pyrolysegeräte werden in der analytischen Pyrolyse bevorzugt eingesetzt [58]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Pyrolyseofen mit einer Widerstandsheizung, ein Pyrojector der Firma SGE, eingesetzt. In Abbildung 6 ist der schematische Aufbau der Pyrojectoreinheit mit dem Übergang zum Interface des Gaschromatographen dargestellt.

Für den Pyrolysevorgang werden wenige Milligramm der jeweiligen Bernsteinprobe aus

ihrer Matrix herauspräpariert und direkt in den Pyrojector eingelassen. Dort gelangen die Proben unter einem kontinuierlichen Wasserstoffstrom in ein Verbrennungrohr. Je nach Adapteranschluß des Pyrojectors zum Interface des Gaschromatographen wurden die Verbrennungsprodukte über ein Split/splitless-Injektorsystem oder über das splitlose PTV-System (KAS 4, Gerstel) auf die Säule der GC-MS-Einheit geleitet. Die beiden gaschromatographischen Injektorsysteme bewirken stark unterschiedliche Chromatogramme, bedingt durch die unterschiedliche Probenaufgabe.

Bei dem *Programmed Temperature Vaporisation* (PTV) System wird die Probe bei einer Temperatur, die niedriger liegt als der Siedepunkt des Lösungsmittels, aufgegeben. Leicht flüchtige Komponenten können auf diese Weise kurzfristig aufkonzentriert werden (Trapping), bevor sie zur Säule geleitet werden. Über ein definiertes Temperaturprogramm wird die Probe bis zur vollständigen Evaporierung im KAS-System aufgeheizt. Über das Interface zum Gaschromatographen gelangen die evaporierten Substanzen fraktioniert zur



**Abb. 7:** Chromatogrammvergleich beider Injektorsysteme bei der Pyrolyse der Probe 6

Säule [62]. Das Ergebnis sind scharfe Peaks über den gesamten Analysenbereich und eine vollständige Aufgabe aller Pyrolyseprodukte auf die Säule. Beim Split/splitless-System wird der Injektorblock isotherm auf 250°C gehalten. Substanzen mit höheren Siedepunkten verbleiben im Interface. Es ist daher nicht auszuschließen, daß einige hochsiedende Pyrolyseprodukte an dieser Stelle auskondensieren. Weiterhin wird bei diesem System der Probenaufgabe auf die Säule normalerweise der Solvent-Effekt ausgenutzt: die stationäre Phase nimmt am Anfang das verwendete Lösungsmittel auf und vergrößert damit ihr Volumen. Die Folge ist eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Substanzen. Leicht flüchtige Komponenten werden angereichert und wandern als scharfe Banden über die Säule. Schwerflüchtige Substanzen, die später eluieren, werden mit zunehmendem Siedepunkt diskriminiert [59]. Für die Pyrolyseuntersuchungen ist daher ein PTV-System vorzuziehen.

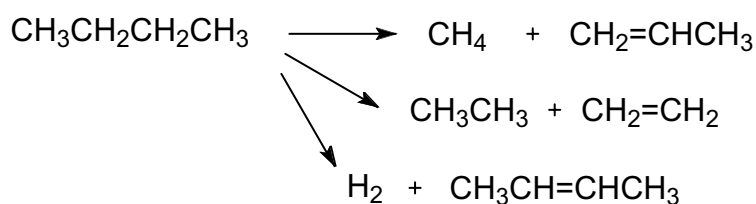
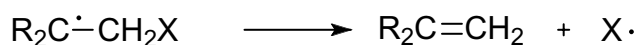
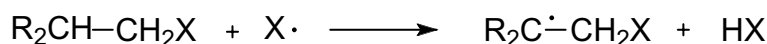
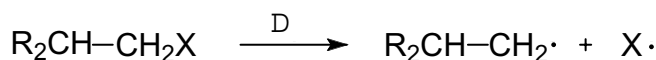
Die mechanistischen Prozesse, die während der Pyrolyse ablaufen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei Temperaturen knapp über 200°C überwiegen zunächst die Dehydratisierungs- und Decarboxylierungsprodukte Kohlenmonoxid und -dioxid. Bei dem Vorliegen von Methoxy- und Acetylgruppen in der Matrix entstehen Methanol, Ameisensäure und Essigsäure [58].

### 3.1.1.2 Allgemeine Darstellung der Reaktionsmechanismen

Allgemein kann bei niedrigen Temperaturen ein höherer Anteil an aliphatischen Komponenten festgestellt werden [63]. Diese nehmen proportional mit steigender Temperatur ab. Stattdessen erfolgt eine gleichzeitige Zunahme der Aromatizität bei Temperaturen zwischen 500°C und 900°C [64]. Bei diesen Degradationsabläufen werden intramolekulare Radikalmechanismen als Ursache angenommen [65]. Die freien Radikale werden vermutlich durch thermische Spaltung der Makromoleküle erzeugt. Es werden folgende Kettenreaktionen diskutiert [57]:

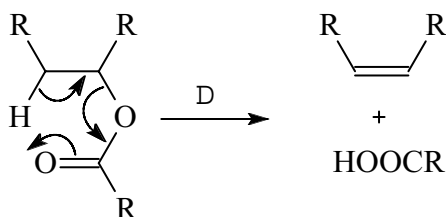
1. Ein thermisch initiiertes Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom aus der Ursprungsmatrix. Es entstehen als Folgeprodukte ein kleineres gesättigtes Molekül und ein neues freies Radikal.
2. Freie Alkylradikale stabilisieren sich durch die Abspaltung von Alkenen. Hierbei sind Cyclisierungsprozesse nicht auszuschließen.

3. Der Radikalkettenabbruch erfolgt durch die Assoziierung oder Disproportionierung zweier Radikale:



Diese radikalischen Reaktionen werden überwiegend bei linearen Polymeren beobachtet. Bei Temperaturen über 600°C werden derartige Prozesse als Erklärungsmodelle für die Formulierung von ungesättigten und aromatischen Pyrolyseprodukten aus nichtlinearen Kettenpolymeren herangezogen.

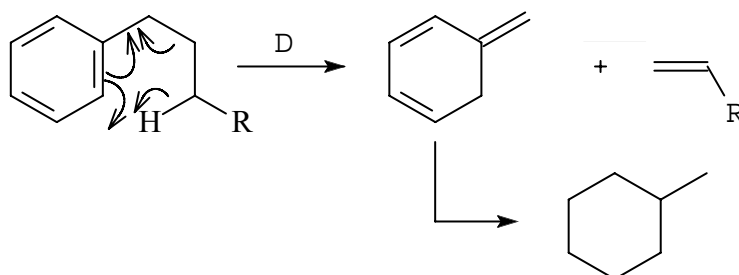
Neben den radikalischen Reaktionen können auch Eliminierungs-, nucleophile Substitutions- und Additionsreaktionen jeglicher Art stattfinden [57]. Bei den Eliminierungsreaktionen wird ein E<sub>i</sub>-Mechanismus postuliert, bei dem über einen cyclischen Übergangszustand aus einer β-Position ein Wasserstoffatom abstrahiert wird:



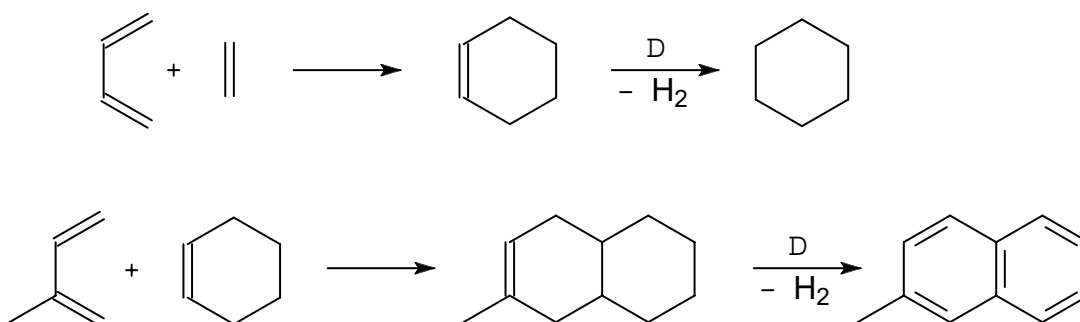
Die Position der abzuspaltenden Gruppe zum β-Wasserstoff spielt dabei eine wichtige Rolle. Diese konzertierte Reaktion findet bei Cyclen mit axialen Gruppen nur dann statt, wenn das Wasserstoffatom in äquatorialer Position steht. Dagegen findet die Spaltung bei äquatorialen Gruppen sowohl mit einem axialen als auch äquatorialen Wasserstoff statt.

Eine weitere Eliminierungsreaktion ist die Dehydratisierung von Carboxylgrup-

pen zu Keten aus Carbonsäuren und zu Alkenen aus Estern und Alkoholen.  
Bei Alkylaromaten kommt es zur Fragmentierung der aliphatischen Seitenkette:



Additionsreaktionen finden bevorzugt zwischen Doppelbindungen oder Kohlenstoff-Hetero-Doppelbindungen statt. Als Endprodukte entstehen häufig aromatische Verbindungen :

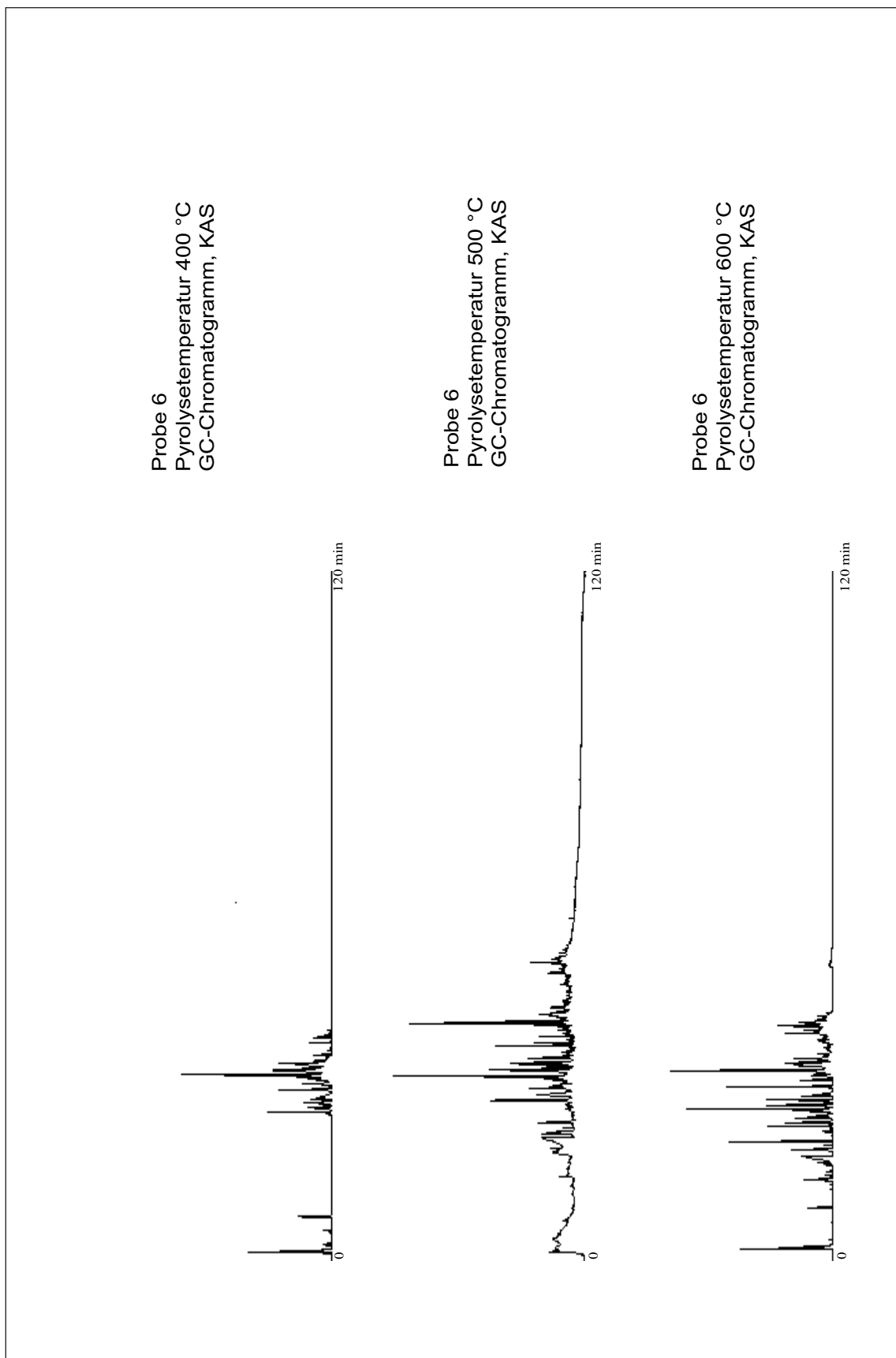


### 3.1.1.3 Pyrolyse des Bernsteins

Die Pyrolyse der Bernsteinproben verfolgt zwei Ziele:

Zum einen eine vollständige Erfassung der Matrix, da bislang hierfür kaum literaturbekannte Untersuchungen vorliegen [66]. Dazu wurden ca. 2 mg aus dem Bernstein direkt herauspräpariert und über einen Feststoffeinlaß in den Pyrojector gegeben. Um die optimale Verbrennungstemperatur zu ermitteln, wurden zuerst Proben aus einem einzigen Stück Bernstein bei verschiedenen Temperaturen oberhalb des Schmelzbereiches pyrolysiert. Abbildung 8 gibt die verschiedenen Chromatogramme bei den verschiedenen Temperaturen wieder. Am aussagekräftigsten war der Pyrolysebereich zwischen 500 und 600°C. Bei 400°C konnten nur sehr wenige Verbindungen detektiert werden. Dagegen war bei Temperaturen über 600°C die Zersetzung in viele kleinere





**Abb. 8** Pyrolyse der Probe 6 bei verschiedenen Temperaturen

Pyrolysebruchstücke schon zu weit fortgeschritten, um noch Rückschlüsse auf die Ursprungsverbindung ziehen zu können. Daher wurden bei der anschließenden Analyse mit der Pyrolyse-GC-MS-Kopplung die Proben sowohl bei Temperaturen von 500°C als auch bei 600°C analysiert.

Zum anderen wird die Verwitterungskruste pyrolysiert. Ihre Präparation erfolgt wie bei allen anderen Proben direkt aus der Matrix und dem Einlaß als Feststoff in den Pyrojector. Über den Vergleich mit den Pyrolyseergebnissen aus den Kernstücken sollen mögliche Rückschlüsse auf den Verwitterungsprozeß gezogen werden, der bei der Lagerung von Bernstein an der Luft eintritt.

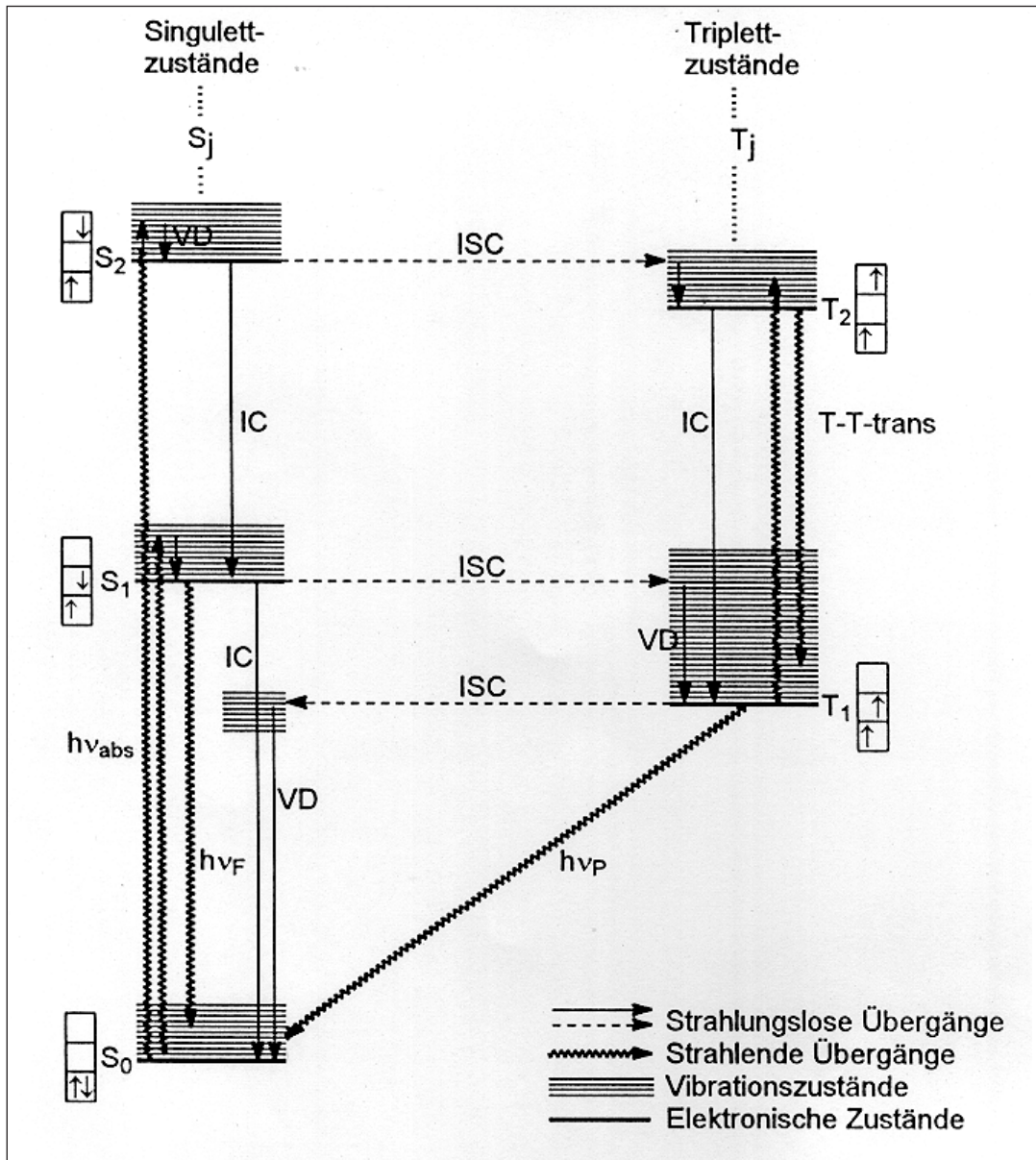
#### 3.1.1.4 Bernsteinpyrolyse mit GC-FTIR-Kopplung

Für weitere Aufschlüsse wurden Proben aus dem Kern und der Verwitterungsrinde mittels Pyrolyse-GC-FTIR analysiert. Bei dieser relativ neuen Technik [67] werden über die *Fourier Transform Infrarot Spektroskopie* charakteristische Banden funktioneller Gruppen angezeigt. Da bei dem Verwitterungsprozeß Oxidationsprozesse [32] postuliert werden, sollen in den IR-Spektren der Krustenproben entsprechende Banden sauerstoffhaltiger Gruppen im Gegensatz zu den Kernstücken zu finden sein.

Zusätzlich wurden als Referenzmaterial einige reine Harzsäuren pyrolysiert. Hierzu liegen bislang keine literaturbekannten Daten vor.

### 3.1.2 Photochemische Degradation

Unter photochemischen Prozessen wird eine Aktivierung der Matrix durch sichtbares oder ultraviolettes Licht verstanden [68, 69, 70]. Bei der photoinitierten Degradation von Polymeren werden Lichtphotonen von der Matrix aufgenommen; es entstehen freie Radikale, die weitere Degradationsprozesse im Polymer anregen. Die photophysikalischen Abläufe sind dabei folgende (Jablonski-Diagramm, Abbildung 9):



**Abb. 9:** Jablonski-Diagramm [71]

1. Absorption des Photons unter Anregung von Elektronen aus dem Grundzustand  $S_0$  in einen energetisch höheren Singulettzustand unter Spinerhalt ( $S_1$ - $S_2$ ).
2. Strahlungslose Relaxation aus den höheren Energieniveaus zu dem nächst niedrigeren elektronischen Zustand (Internal Conversion, IC) unter Beibehalt des Singulett.
3. Umwandlung des Singulettzustandes ( $S$ ) in einen Triplettzustand ( $T_1$ ) unter Spinumkehr bei weiterer Relaxation (Intersystem Crossing, ISC). Voraussetzung für diesen eigentlich verbotenen Übergang sind genügend lange Verweilzeiten auf einem Singulettniveau und geringe Energiedifferenzen zwischen dem

Singulett- und dem Triplettzustand. Höhere Triplett-niveaus werden bei erneuter Aufnahme von Photonen und der dadurch bedingten Anregung von Elektronen auf T<sub>2</sub> erreicht. Eine direkte Anhebung von Elektronen aus dem Grundzustand S<sub>0</sub> auf ein Triplett-niveau ist eine wegen des Spinerhaltungssatzes verbotene Transaktion.

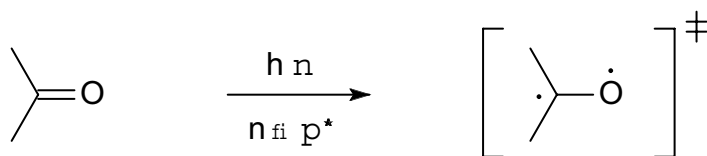
4. Bildung freier Radikale aus der Singulett- oder Triplettmultiplizität.

5. Energetische und elektronische Transferprozesse zwischen Donor und Akzeptormolekülen.

6. Deaktivierung von S<sub>1</sub> erfolgt unter Abgabe von Strahlung (Fluoreszenz); Phosphoreszenz tritt bei der Deaktivierung von T<sub>1</sub> auf S<sub>0</sub> unter Spinumkehr auf.

7. Dissoziationsprozesse.

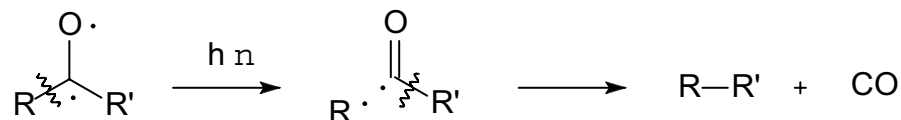
Voraussetzung für eine erfolgreiche Absorption ist eine ausreichende Energie der Photonen. Der Vorteil einer photochemischen Reaktion im Vergleich zu einer thermischen ist die gezielte Anregung einzelner Molekülarten und einzelner funktioneller Gruppen innerhalb des Moleküls. So können Carbonylgruppen bei Wellenlängen >300 nm Photonen absorbieren. Dabei geht ein Elektron aus einem nichtbindenden p-Elektronenpaar in ein antibindendes Orbital über ( $n \rightarrow p^*$ ), wobei ein Diradikal (Abbildung) entsteht:



1. Rekombination der Elektronen.

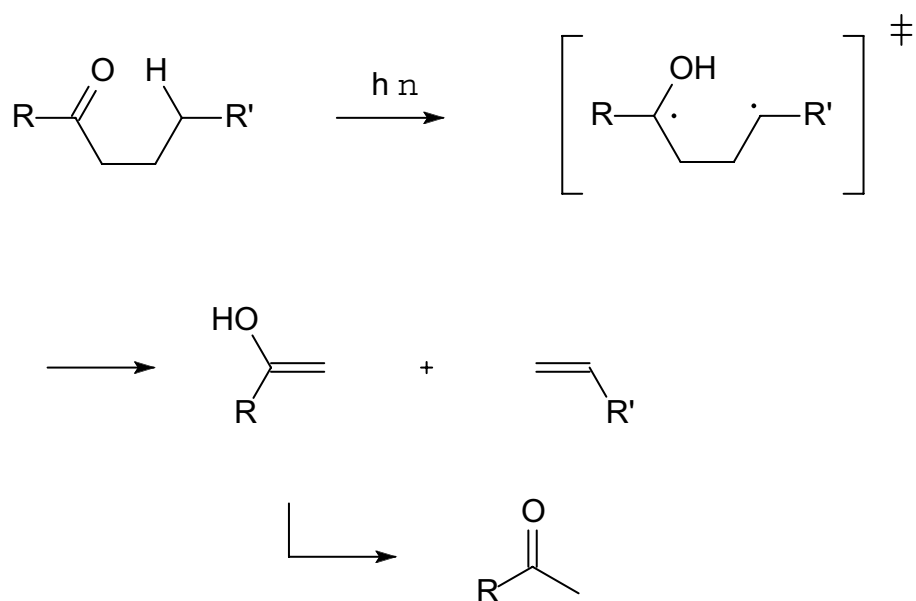
2. Addition an eine olefinische Doppelbindung unter Bildung eines Cycloadduktes.

3.  $\alpha$ -Spaltung der zur Carbonylgruppe benachbarten C-C-Einfachbindung (Norrish-Typ-I-Spaltung):

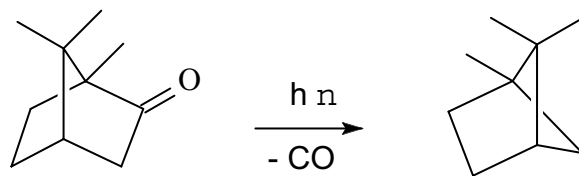


4. Intramolekulare Wasserstoffabstraktion oder Addition eines Elektrons unter Bildung eines reduzierten Adduktes (Photoreduktion).

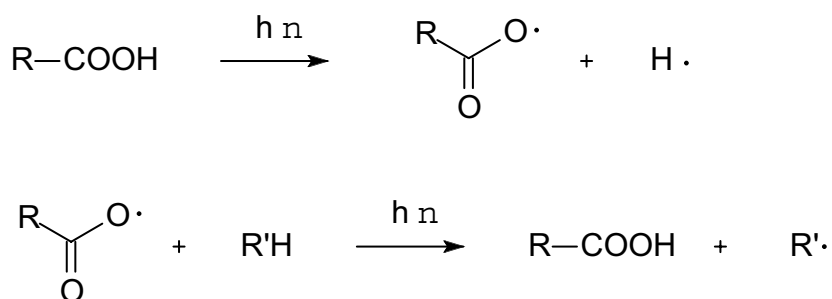
5. Intramolekulare Wasserstoffabstraktion aus der  $\gamma$ -Position zur Carbonylgruppe (Norrish-Typ-II-Spaltung):



Bei der Photolyse von Ringketonen werden intramolekulare Folgereaktionen beobachtet, die zu ungesättigten Aldehyden führen. Ein anderer Reaktionsweg ist die Abspaltung von Kohlenmonoxid, wie hier am Beispiel von Campher wiedergegeben:



Freie Radikale können im allgemeinen jederzeit Wasserstoff aus dem Polymer abstrahieren. So werden Wasserstoffabstraktionen von organischen Säuren beobachtet. Die entstandenen Säureradikale wiederum entziehen der Polymermatrix ein Wasserstoffradikal zur Regeneration der Säurefunktion. Alkylspaltungen dagegen finden nur bei Wellenlängen unterhalb 200 nm statt.



Die photochemische Bestrahlung von Bernstein mit UV-Licht wurde mit der Intention durchgeführt, einzelne Gruppen in der Matrix anzuregen und so kleinere Addukte aus der Matrix herauslösen zu können, die weitere Hinweise auf funktionelle vernetzende Gruppen liefern. Dazu wurde feinst zermörserter Bernstein in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom jeweils 19 h mit unterschiedlichen UV-Lampen bestrahlt. Anschließend wurden die Proben in einem Mikrowellenofen extrahiert und die lösliche Fraktion gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert.

## **3.2 Analyse löslicher Bestandteile**

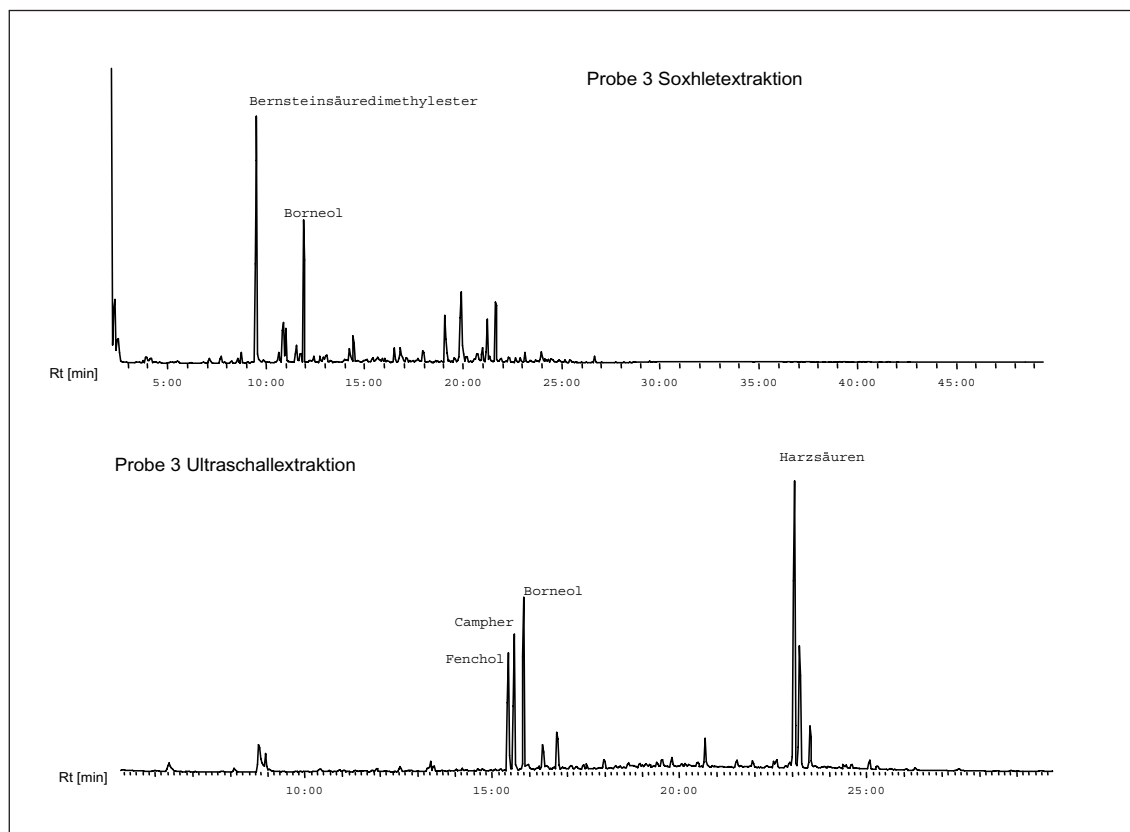
### **3.2.1 Probenaufbereitung**

#### **3.2.1.1 Extraktion von Bernstein**

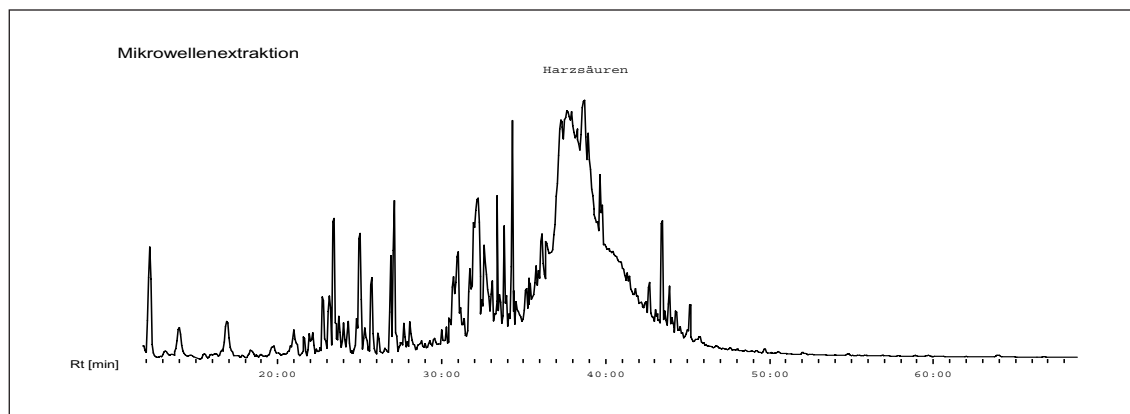
Für die Isolierung niedermolekularer Substanzen aus festen Probenmatrizes bietet sich die Flüssigextraktion an. Sie zeichnet sich durch eine einfache Handhabung und die damit verbundene Minimierung von Fremdkontaminierung sowie durch eine hohe Anreicherungs-effizienz aus. Hierbei haben die Eigenschaften des Extraktionsmittels, die Probenvorbereitung und die Extraktionsbedingungen einen wesentlichen Einfluß auf die Ausbeute. Gebräuchliche Techniken sind Soxhletextraktion, Wasserdampfdestillation und die ultraschall- oder mikrowellenunterstützte Flüssigextraktion. Laut Literatur lassen sich für unpolare mittelflüchtige Stoffe durch Soxhletextraktionen minimal höhere Ausbeuten erzielen [72].

Bei einem Vergleich von Soxhletextraktion mit der ultraschall- bzw. mikrowellenunterstützten Flüssigextraktion von Bernsteinproben kann diese Aussage nicht bestätigt werden. So ist das extrahierte Substanzspektrum bei gleicher Probenmenge und gleichem Lösungsmittel (Dichlormethan) bei einer einmonatigen Soxhletextraktion deutlich kleiner als bei den beiden anderen Methoden (Abbildung 10). Die Hauptsubstanz aus der Soxhletextraktion wurde als Bernsteinsäuredimethylester identifiziert. Bei allen anderen Extraktionen liegt diese Verbindung quantitativ nur in sehr geringen Mengen vor. Im Vergleich zur Mikrowellen- und Ultraschallextraktion sind bei der Soxhletextraktion deutlich längere Extraktionszeiten und höhere Temperaturen notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrowellenextraktion als Aufarbeitungsmethode verwendet, da sich hier das breiteste Substanzspektrum erzielen läßt (Abbildung 11). Wie Kapitel 5.6 zeigt, finden zusätzliche Reaktionen durch Mikrowelleneinwirkung nicht statt.



**Abb. 10:** Vergleich Soxhlet/Ultraschallextraktion nach anschließender Methylierung



**Abb. 11:** Chromatogramm der unmethylierten Lösung nach Mikrowellenextraktion der Probe 3

Verschiedene polare Lösungsmittel mit zum Teil recht hohen Siedepunkten werden in Vorversuchen als Extraktionsmittel in der Mikrowelle bei Zugabe von Bernsteinsäure überprüft. Dabei stellt sich heraus, daß die Bernsteinsäure, die in den Bernsteinproben vorhanden ist, einige Lösungsmittel bei höheren Temperaturen in der Mikrowelle zersetzt und Nebenreaktionen eintreten (Tabelle 5). Andere Extraktionsmittel zeigen einen sehr geringen Extraktionserfolg. Die besten Ergebnisse lassen sich mit THF und Dichlormethan als Extraktionsmedium mit Gesamtausbeuten von ca. 40% erzielen.



**Tab. 5:** Ergebnisse der verschiedenen Lösungsmittelversuche

Lösungsmittel	Siedepunkt [°C]	Ausbeute [%]	Polarität [Et]	Zersetzung der Proben
Heptan	98	15	30,9	negativ
Xylol	138	33	33,2	negativ
Mesitylen	162-164	27	33,1	negativ
Tetrahydrofuran	65-67	42	37,4	negativ
Diethylenglykoldimethylether	162	38	38,6	positiv
Dichlormethan	40	40	41,1	negativ
Nitrobenzol	210-211	26	42,0	positiv
N,N-Dimethylformamid	153	15	43,8	positiv
Dimethylsulfoxid	189	15	45,0	positiv
Methanol	65	21	55,5	negativ

Das breiteste Substanzspektrum wurde mit der Extraktion mit Diethylenglykoldimethylether erzielt, da wegen seines hohen Siedepunkts die Mikrowellenextraktionen bei 820 W durchgeführt werden konnte. Dieses Lösungsmittel kann für die Analyse des Bernsteins dennoch nicht verwendet werden, da durch die Bernsteinsäure der Diethylenglykoldimethylether zersetzt wird und durch die Mikrowellenstrahlung zusätzliche Polymerisationsreaktionen stattfinden.

Weiterhin wurde eine Bernsteinprobe einen Monat mit konzentrierter Natronlauge unter Rückfluß behandelt mit der Intention, kleine Bruchstücke zu erhalten oder mögliche Esterbindungen zu verseifen. Anschließend wurde die Lösung mit Dichlormethan extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Es konnte dabei lediglich festgestellt werden, daß die heiße Natronlauge in der Lage ist, den Bernstein anzugreifen. Kleinere Spaltungsprodukte wie Alkane wurden identifiziert. Eine vernünftige Auswertung war aufgrund der übergroßen Anzahl an Verbindungen, die sich gaschromatographisch nicht trennen ließen, nicht durchführbar.

Für die Mikrowellenextraktion wurde der Bernstein unter flüssigem Stickstoff feinst zermörkert. Zunächst wurden drei Extraktionen mit THF durchgeführt. Daran anschließend erfolgte je dreimal eine Extraktion in Dichlormethan. Alle Extrakte wurden vereinigt und unter einem stetigen Stickstoffstrom eingeeengt. Zurück blieb ein gelbes, stark viskoses Öl.

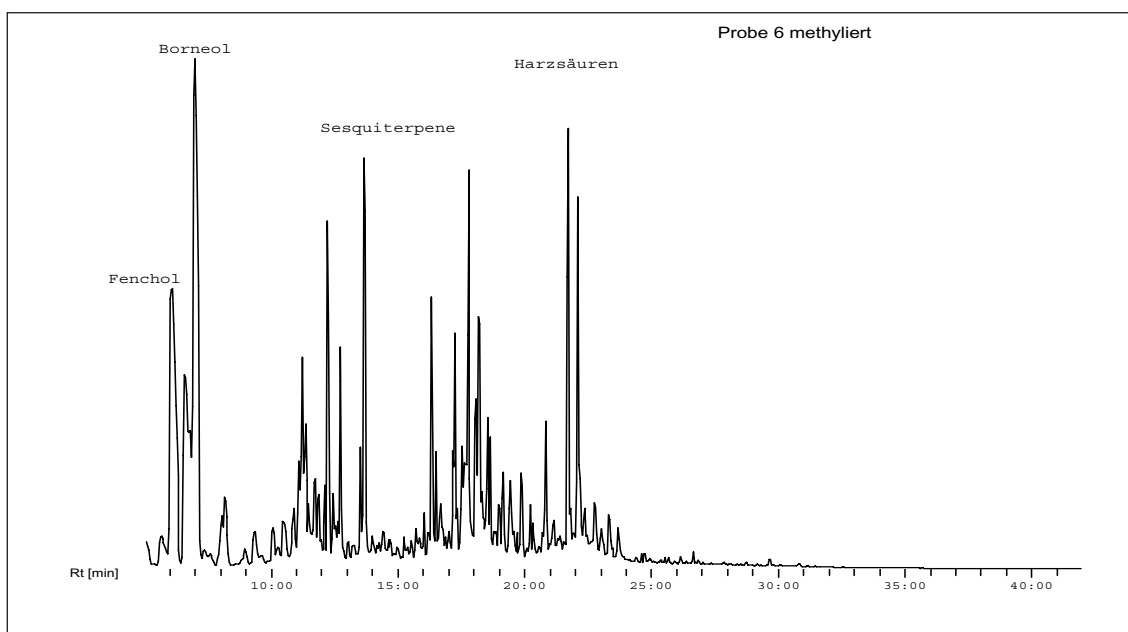
Dieses Öl wurde mit wenig Dichlormethan aufgenommen und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Insgesamt wurden 7 verschiedene

Proben Baltischen Bernsteins untersucht. Ein gaschromatographischer Vergleich zeigte nur minimale Unterschiede.

Diese Erkenntnis wird durch chemotaxonomische Analysen verschiedener Koniferenharze [56] bestätigt. Die Untersuchungen weisen auf artspezifische Terpenmuster hin, die vermutlich genetisch bedingt sind. Damit ist die Bildung der Harze und ihrer Inhaltsstoffe artspezifisch und unabhängig von Standort und Alter.

### 3.2.1.2 Derivatisierung von Bernstein und seinen Extrakten

In dem Gesamtextrakt (Abbildung 12) sind einige Substanzklassen aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften nur schlecht einer gaschromatographischen Analyse zugänglich. Hierzu zählen besonders die Harzsäuren, die durch ihre polare Carboxylgruppe in einer starken Wechselwirkung mit der stationären Phase des chromatographischen Systems stehen und somit eine schlechte Trennleistung bewirken. Um einem solchen Elutionsverhalten auf der stationären Phase entgegenzuwirken, werden diese polaren Gruppen derivatisiert und so die Polarität vermindert. Hierzu bietet sich besonders bei freien Carboxylgruppen die Methylierung mittels Diazomethan an [73].



**Abb. 12:** Chromatogramm der methylierten Probe P6

Eine weitere Methylierungsmethode für Polymere ist die Umsetzung aktiver Protonen mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) [74, 75, 76]. Dieses Reagenz wird bevorzugt bei der Pyrolyse eingesetzt, da die Methylierung der sauren und alkoholischen Gruppen direkt im Pyrolyseofen durchgeführt werden kann. Dazu wird der zermörserte Bernstein mit einer wäßrigen Lösung TMAH versetzt und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Zurück bleibt ein heterogener brauner Feststoff, der in den Pyrojector eingetragen wird. Die anschließende Methylierung findet bei Temperaturen ab 250 °C statt. Wegen der direkten Methylierung im Pyrolyseofen wird diese Technik als *simultaneous pyrolysis methylation* (SPM) bezeichnet.

Um Erkenntnisse über Monoterpenester in der löslichen Fraktion zu erhalten, wurde ein Teil des Extraktes mit Natriummethanolat versetzt [77]. Auf diesem Weg sollte eine Ummethylierung der Ester zur Freisetzung der Monoterpene erzielt werden. Mit dieser Methode konnten jedoch keine weiteren Monoterpene außer den bereits bekannten nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Fraktionierung mit chromatographischen Methoden

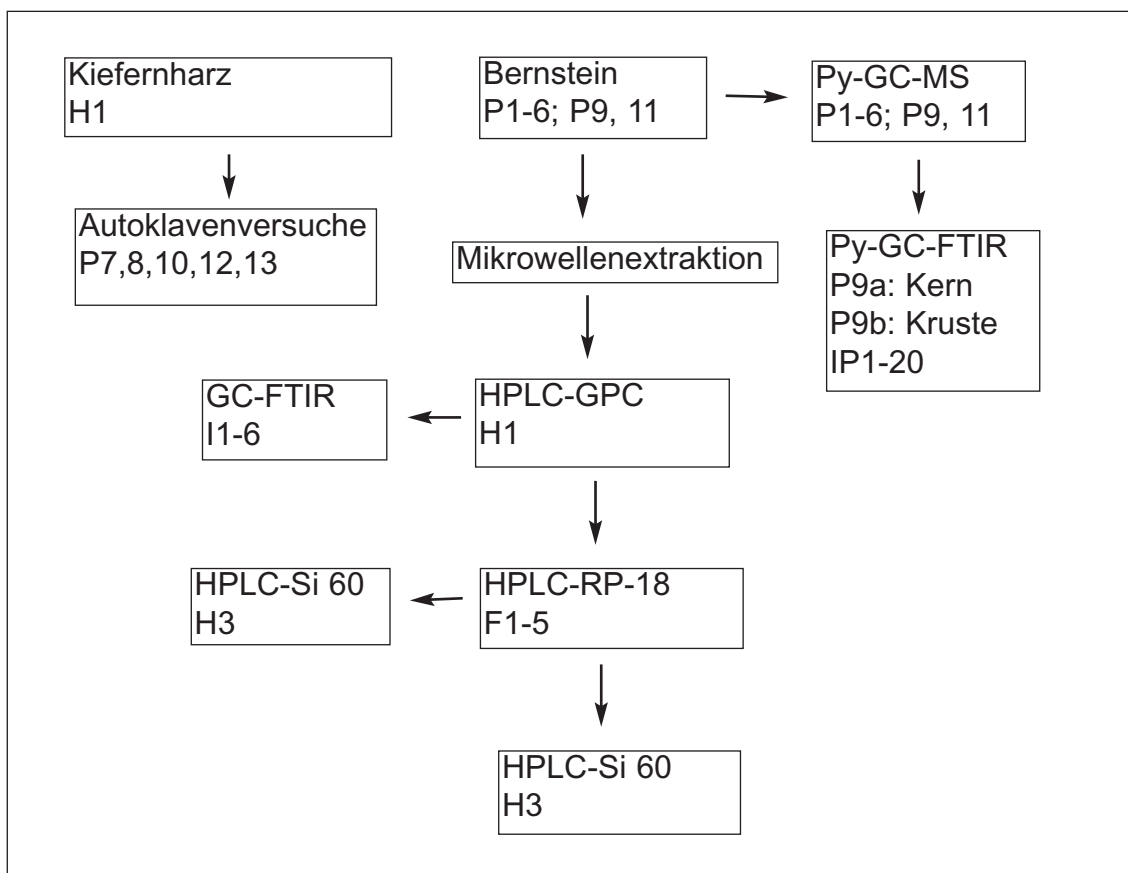
Wie die bisher dargestellten Gaschromatogramme zeigen, besteht Bernstein aus einem komplexen Stoffgemisch. Konzentrationsunterschiede dieser Stoffe erschweren zusätzlich die Analytik. Substanzen im Spurenbereich können zwar mittels Massenspektrometrie bedingt erfaßt werden, ihre Isolierung ist dagegen kaum möglich. Um derartige komplexe Gemische besser analysieren zu können, ist eine weitere Auftrennung in möglichst einzelne Stoffgruppen oder die Isolierung einzelner Verbindungen notwendig.

Hierbei haben sich neben der säulenchromatographischen Trennung an Kieselgelsäulen besonders die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) bewährt. Für polymere Komplexe bieten sich zusätzlich die Verwendung von Sephadex-Säulen im Bereich der Flüssigchromatographie [78, 79] und die *Gel Permeations Chromatographie* (GPC) an, bei der nach Molekulargewicht getrennt wird.

Kombinationen verschiedener chromatographischer Trennverfahren führen zu Fraktionen mit einer geringen Substanzanzahl (Abbildung 13), im Idealfall zur

Isolierung einer einzigen Verbindung.

In der vorliegenden Arbeit erwies sich gerade der letzte Schritt als besonders



**Abb. 13** Probenbezeichnung der einzelnen Fraktionen

schwierig, da die einzelnen chemischen Stoffe für sich genommen in einer sehr geringen Konzentration im Extrakt vorlagen bzw. zu geringe Polaritätsunterschiede aufwiesen, um sie einzeln isolieren zu können.

Eine Isolierung durch Kombination von HPLC und Säulenchromatographie konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Als weitere Methode wurde die präparative Dünnschichtchromatographie verwendet, die eine Auftrennung geringer Substanzmengen ermöglicht, jedoch Nachteile in der Anreicherung der isolierten Substanzen mit sich bringt: Es können nur geringe Mengen Probensubstanz auf die stationäre Phase aufgebracht werden. Anschließend werden die einzelnen Verbindungen von der stationären Phase vollständig extrahiert. Dazu wurden im ersten Schritt die einzelnen Fraktionen kalt mit n-Hexan ausgeschüttelt. Danach wurden die noch auf der stationären Phase verbliebenen Substanzen durch eine Mikrowellenbestrahlung in Dichlormethan herausgelöst. Abschließend wurde eine Soxhletextraktion mit Methanol durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden eingengt, mittels

Gaschromatographie untersucht und vereinigt, wenn sich keine Unterschiede der Inhaltsstoffe zeigten.

### 3.2.2.1 Sephadex

Für die Trennung von labilen Naturstoffen können Polymere aus Kohlenhydraten wie zum Beispiel *Sephadex* verwendet werden [80]. Dieses dreidimensionale Polymer verbindet wasserlösliche Dextraneinheiten mit Epichlorhydrin über Glycerin-Ether-Bindungen. Das Ergebnis ist ein hydrophiles Polymer mit der Eigenschaft, in Wasser oder Methanol zu quellen. Dieses Quellvermögen hat Einfluß auf die zu chromatographierende Molekülgröße. *Sephadex* besitzt damit neben einem Adsorptionsvermögen auch Gel Permeations Eigenschaften. Das in dieser Arbeit für die Säulenchromatographie verwendete *Sephadex LH-20* ist für Molekulargewichte zwischen 100 bis 4000 g/mol geeignet. Es wurden jeweils 1,5 g Sephadex in 20 mL Methanol für zwei Säulen über Nacht aufgequollen. Auf diese Säulen wurden jeweils ca. 1 g der methylierten Probe P9 gegeben, und mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde versucht, eine Trennung des Gemisches zu erzielen.

### 3.2.2.2 Silbernitratthaltige Kieselgelsäulen

An mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel lassen sich ungesättigte Verbindungen gut auftrennen [81]. Diese Methode eignet sich sowohl für die Dünnschicht- als auch für die Flash-Säulenchromatographie. Die Trennung erfolgt über die Bildung von Charge-Transfer-Komplexen zwischen der ungesättigten Bindung und dem Silbernitrat, wobei die Silberionen als Elektronenakzeptor und die ungesättigte Bindung als Elektronendonator fungieren. Die Stabilität dieser Komplexe ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

1. Je länger die Kette, desto instabiler der Silberkomplex.
2. Ungesättigte Ketten und cyclische Verbindungen bilden stabilere Komplexe

als aromatische Substanzen.

3. Je höher der Substitutionsgrad an der Doppelbindung, desto stabiler der Komplex. *Cis*-Konfigurationen sind gegenüber *trans*-ständigen Verbindungen bevorzugt.

4. Je isolierter die Doppelbindungen im einem mehrfach ungesättigten System, desto größer die Stabilität.

Der Silberkomplex wiederum beeinflusst die Adsorptionsgeschwindigkeit auf dem Kieselgel. Mehrfach ungesättigte Verbindungen werden länger auf der stationären Phase festgehalten als gesättigte. Für die Fraktionierung der Bernsteinextrakte wurde die Imprägnierung sowohl für die Dünnschicht- als auch die Säulenchromatographie angewandt. Als Laufmittel wurde, wie auch für das einfach aktivierte Kieselgel, ein Gemisch aus Hexan/Diethylether 9/1 eingesetzt. Auch hier wurden für eine Trennleistung die methylierten Bernsteinextrakte verwendet, um eine gute Trennleistung zu erzielen.

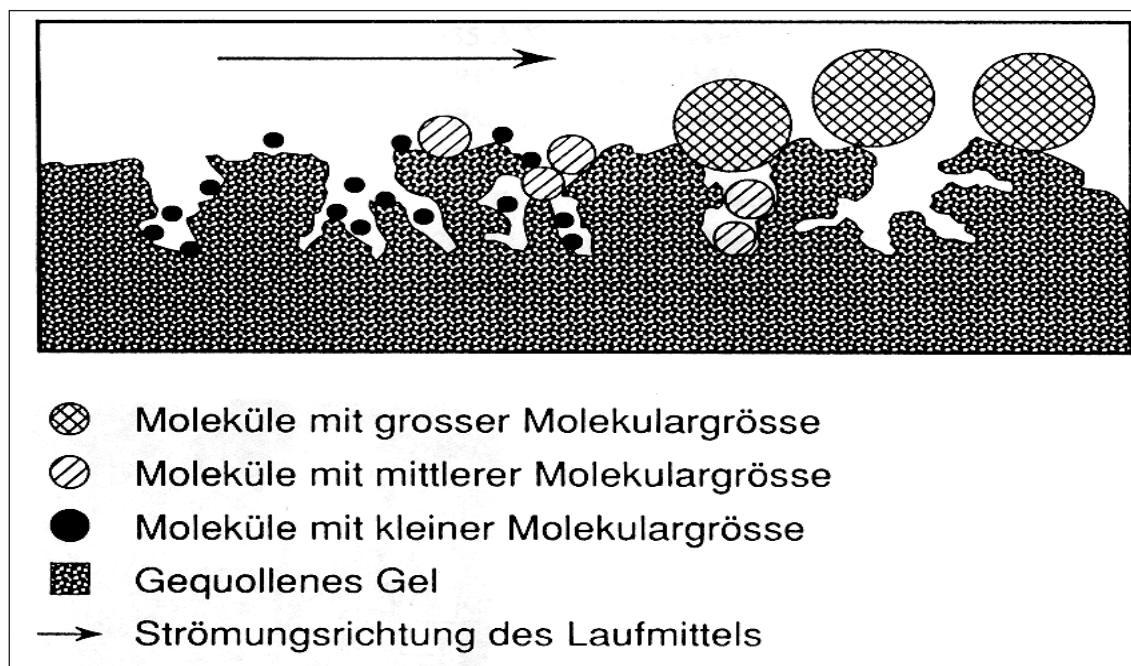
### 3.2.2.3 HPLC

Die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ist neben der Gaschromatographie ein wichtiges Trennverfahren für komplexe Gemische [82, 83, 84]. Um Gemische mit ähnlichen chromatographischen Eigenschaften zu trennen, sind entweder lange Analysenzeiten oder Polaritätsänderungen der mobilen Phase notwendig. Ein weiterer Vorteil der HPLC ist die Trennmöglichkeit thermisch instabiler oder nichtflüchtiger Gemische und Polymere mit hohen Molmassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die aus der Mikrowellenextraktion gewonnene Bernsteinlösung zuerst über eine präparative HPLC vorgetrennt (H1). Als stationäre Phase wurde eine 60 cm lange Gel-Permeationssäule (HPGPC) von 100 Å eingesetzt. Bei der Gel-Permeation liegt eine hydrophobe stationäre Phase vor, die unpolare Spezies nach ihrer Molekülgröße unterscheidet [78]. Die Elution erfolgt dabei mit abnehmendem Molekulargewicht. Der Vorteil der Gel-

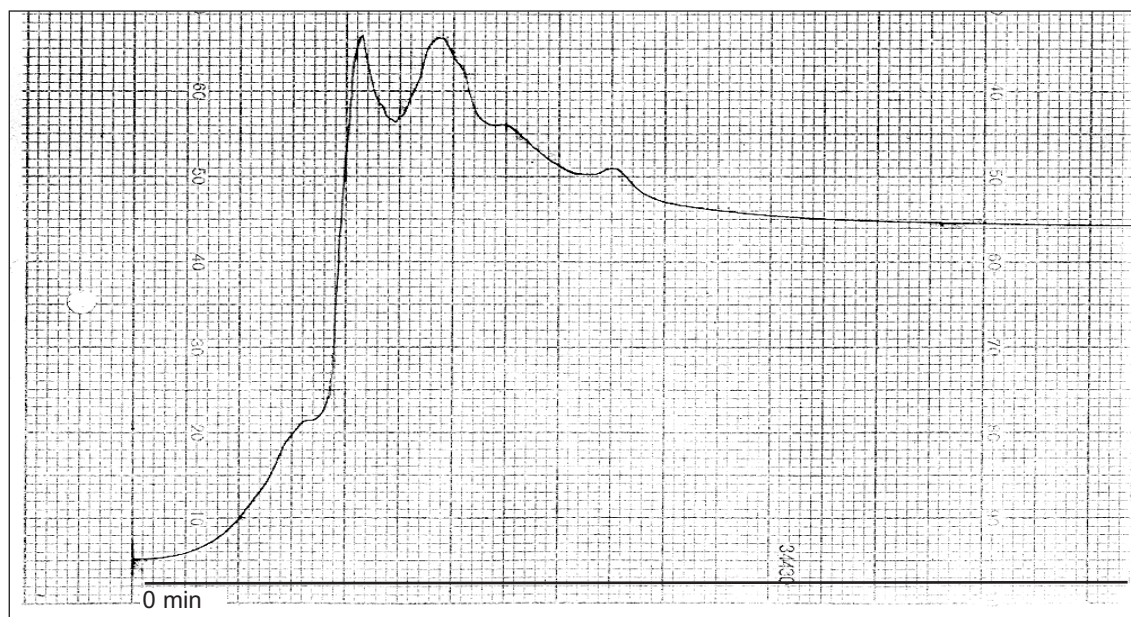


Permeation liegt in einer vollständigen Eluierung aller Substanzen auf Kosten einer umfassenden Trennung. Ursache hierfür ist das begrenzte Trennvolumen der stationären Phasen, abhängig von ihrer Porengröße. Die mobile Phase hat auf die Trennleistung keinen Einfluß und fungiert ausschließlich als Transportmedium (Abbildung 14) [85].



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Elutionsabfolge bei einer GPC-Säule

Die Detektion der Lösung H1 erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm (Abbildung 15).



**Abb. 15:** Chromatogramm von H1 bei 254 nm, Geschwindigkeit 20 mm/min

Die UV-aktiven Substanzen, die in dem obigen Chromatogramm in den ersten 8 Minuten eluierten (siehe Kapitel 5.4), wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Da keine Unterscheidungen dieser Fraktionen festgestellt werden konnten, wurden sie anschließend vereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter Stickstoff blieb ein gelbes, schwach fluoreszierendes Öl zurück.

Für den nächsten Trennschritt wurde ein Teil des gelben Öls in Methanol gelöst. Dabei fiel ein farbloser Feststoff aus, dessen Schmelzpunkt bei 169 °C lag. Nach Abtrennung des Niederschlages wurde die methanolische Lösung mit der analytischen HPLC an einer 4 mm RP-18-Säule weiter aufgetrennt. Eine optimale Trennleistung wurde mit einem Methanol/Wasser Gradienten erzielt (siehe Experimenteller Teil).

Die Trennung des gelben Öls H1 an der RP18-Phase ergab 5 Fraktionen (H2-5). Wie die anschließende gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung zeigt, bestehen die einzelnen Fraktionen aus Gemischen von bis zu vier Hauptsubstanzen.

Anschließend wurde versucht, die einzelnen Fraktionen H2-5 über eine Kieselgelsäule Si 60 weiter aufzutrennen (H6). Dazu mußte zunächst der Wasseranteil der Fraktionen entfernt werden. Dieses geschah durch Zugabe von Molekularsieb und anschließender Gefriertrocknung, da beim Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum die Substanzen mitgerissen wurden. Die gängige Methode des Ausschüttelns mit z.B. Pentan blieb erfolglos.

Da bei der Wasserentfernung ein hoher Substanzverlust auftrat, konnte eine weitere Trennung der Fraktionen H2-5 nicht erzielt werden.

Daher wurde eine erneute Trennung an der Kieselgelphase direkt mit dem gelben Öl (H1) ohne den vorherigen Trennschritt an der RP18-Phase durchgeführt. Es konnten drei Fraktionen (H7-9) erhalten werden. Da sich die Trennleistung der Kieselgelsäule durch eine geringe Reproduzierbarkeit auszeichnete, war es nicht möglich, eine für NMR-Analysen ausreichenden Menge einer reinen Fraktion zu gewinnen.

Mit Hilfe des Diodenarraydetektors lassen sich von HPLC-Peaks UV-Spektren erhalten. Diese führen über spezielle Datenbanken oder durch einen Vergleich von UV-Spektren von Referenzmaterialien zur Substanzidentifizierung. Da die UV-Spektren geräteabhängig sind, stehen allerdings kaum geeignete Datenbanken zur Verfügung.



### 3.2.3 Instrumentelle Analytik

Sämtliche Fraktionen wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht und - wenn möglich - charakterisiert. Dabei gelten organische Verbindungen als eindeutig identifiziert, wenn die unbekannten Massenspektren und ihre Retentionszeiten mit bekannten Referenzsubstanzen unter gleichen experimentellen Bedingungen übereinstimmen.

Eine Möglichkeit zur Analyse besteht in der Zuordnung unbekannter Massenspektren über den Vergleich mit speziellen Spektrenbibliotheken und Datenbanken. Hierbei ist die strukturelle Eigenschaft eines Moleküls für die Massenspektrometrie von Bedeutung. Über charakteristische Fragmentierungen und die Intensität einzelner Fragmentionen kann auf funktionelle Gruppen, strukturelle Untereinheiten und Stabilität geschlossen werden. Kann aus dem Molekulargewicht und den Fragmentionen eine sinnvolle Struktur vorgeschlagen und können weitere Isomere ausgeschlossen werden, so gilt ein Strukturvorschlag als verifiziert. Idealerweise schließt sich daran ein Vergleich mit einer Referenzsubstanz an.

Sind dagegen weitere Isomere mit vergleichbaren Fragmentationsmustern nicht auszuschließen, kann eine eindeutige Strukturzuordnung eines Isomers nur über die zusätzlich ermittelte gaschromatographische Retention erfolgen. Hierzu können bei gleichen experimentellen Bedingungen - übereinstimmende Selektivität der Trennphasen, vergleichbare Trennbedingungen und gleiche Bezugskomponenten - Retentionszeiten bzw. der für die temperaturprogrammierte Gaschromatographie modifizierte Kovats-Index herangezogen werden. Weiterhin kann für die Elutionsabfolge von Isomerengemischen auf publizierte Daten strukturell ähnlicher Verbindungen für die gaschromatographische Retentionsabsicherung zurückgegriffen werden.

Stehen keine käuflichen Referenzmaterialien zur Verfügung, müssen diese auf synthetischem Wege hergestellt werden. Anschließend erfolgt ein Vergleich des Massenspektrums der unbekannten Verbindung mit dem der synthetischen Substanz.

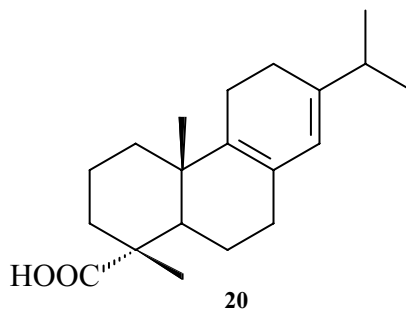
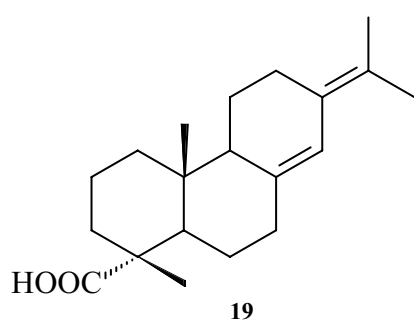
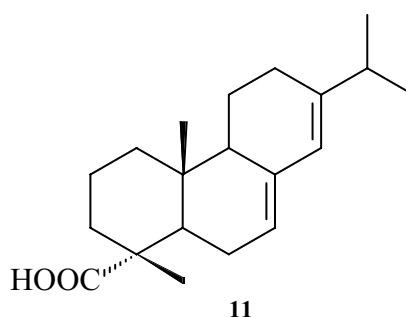
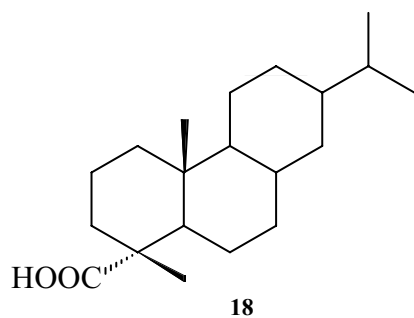
### 3.2.3.1 GC-MS

Die Analysen zur Identifizierung der organischen Inhaltsstoffe im Baltischen Bernstein wurden mit einem Quadrupol-Massenspektrometer im niederaufgelösten full-scan Modus (EI+, 70 eV) für einen Massenbereich von 35 bis 800 Dalton durchgeführt.

Neben der Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist die Massenspektrometrie ein wichtiges Instrument zur Identifizierung und Strukturaufklärung organischer Substanzen. Die wesentlichen Vorteile liegen in der geringen zu analysierenden Probenmenge und, bei einer Kopplung mit der Gaschromatographie, in der Möglichkeit Gemische zu untersuchen. Aus der Interpretation der Massenspektren lassen sich über Fragmentierungsmechanismen Strukturen postulieren und verifizieren. Für einzelne Stoffklassen sind typische Fragmentierungsmuster charakteristisch, für die sich Regeln aufstellen lassen. Für die Klasse der Terpene gibt es wenige Fragmentierungsregeln [86, 87, 88], die mit zunehmender Anzahl von Kohlenstoffen im Skelett reziprok proportional abnehmen. So finden sich in der Literatur am häufigsten Fragmentierungsmechanismen zu den Monoterpenen. Insbesondere für Sesquiterpene oder Diterpene sind nur wenige Mechanismen beschrieben. Diese wurden vorwiegend auf der Basis von Diterpenen ermittelt, deren Strukturen zuvor mittels NMR-Spektren aufgeklärt wurden.

In der Klasse der Diterpene wurden die Harzsäuren bislang am häufigsten untersucht [90]. Wie der Name impliziert, treten diese Säuren häufig in frischen Harzen, aber auch in der Baumrinde und Nadeln auf und stellen neben den Monoterpenen einen mengenmäßig großen Anteil am Substanzspektrum dar [56]. Umfangreiche Untersuchungen zur Strukturaufklärung dieser diterpenoiden Substanzen fanden daher mit verschiedenen Koniferenharzen statt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen implizieren das Vorliegen der gleichen Diterpene im Bernstein. Aus den Harzen wurden folgenden Grundskeletttypen identifiziert:

## 1. Abietanhomologe



Dehydroabietinsäure (**18**)

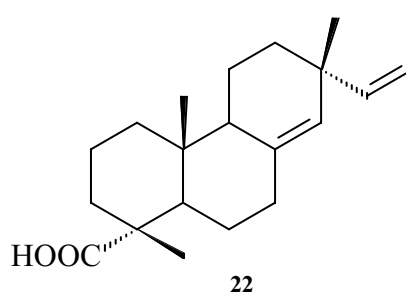
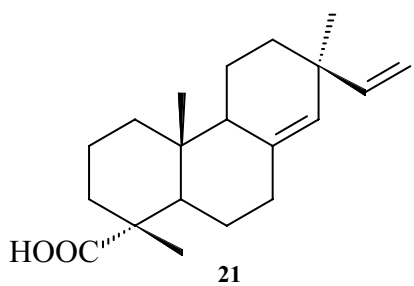
7,13-Abietinsäure (**11**)

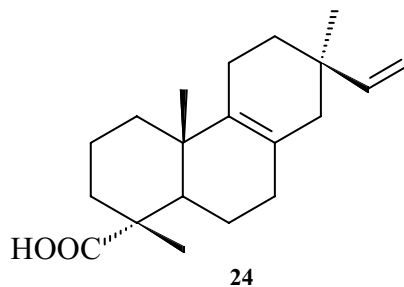
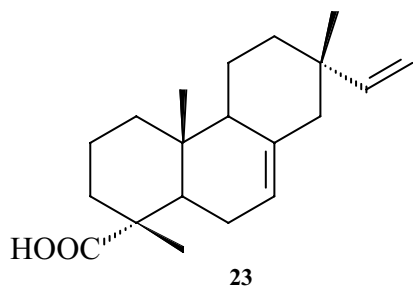
8(14),13(15)-Neoabietinsäure (**19**)

Pallustrinsäure (**20**)

Weiterhin wurden die entsprechenden Kohlenwasserstoffe, Alkohole und Aldehyde gefunden.

## 2. Pimaranhomologe





8(14),15-Pimarsäure (**21**)

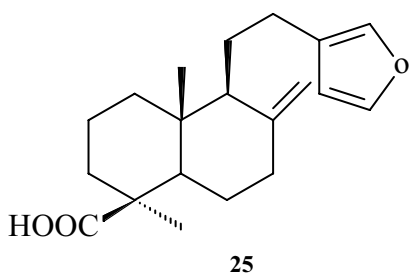
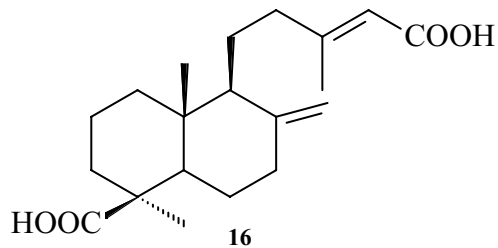
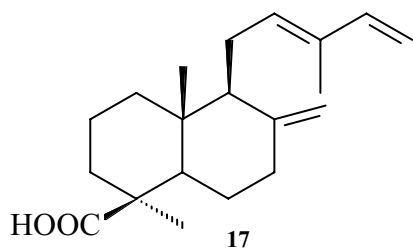
Sandaracopimarsäure (**22**)

7,15-Isopimarsäure (**23**)

8,15- Pimarsäure (**24**)

Die hier abgebildeten Pimarsäuren stellen bedingt durch das Stereozentrum an C13 nur eine kleine Auswahl dar. Auch hier wurden die entsprechenden Kohlenwasserstoffe, Alkohole und Aldehyde in Koniferenharzen gefunden.

### 3. Labdanhomologe



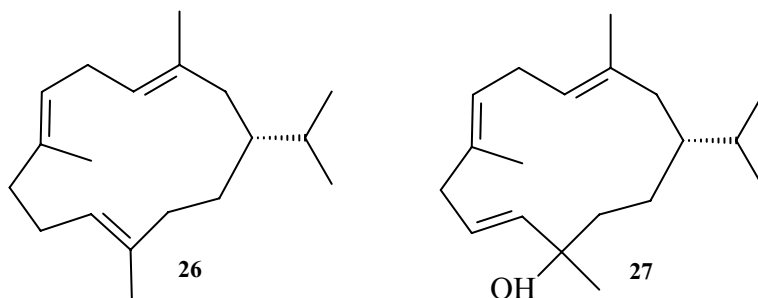
trans-Cumunicsäure (Elliotinsäure) (**17**)

Agathicsäure (**16**)

Lambertianicsäure (**25**)

Entsprechende Labdanderivate mit Hydroxygruppen anstelle der Doppelbindungen wurden in verschiedenen Kiefernarten identifiziert.

#### 4. Cembranchomologe



Cembren (26)

Cembrol (27)

Während die hier erwähnten Aldehyde und Alkohole ein charakteristischer Bestandteile von Kiefernharzen sind, wurden sie als Inhaltsstoffe im Bernstein in der Literatur bislang nicht beschrieben. Neben zahlreichen Mono- und Sesquiterpenen kommen in den Harzen in geringen Spuren Triterpene, Nor-Verbindungen der Diterpen und mehrfach funktionalisierte Abietanderivate vor [75]. Auch diese Verbindungen konnten im Bernstein bislang nicht identifiziert werden.

Eine umfangreiche Übersicht über die bis Anfang der siebziger Jahre identifizierten diterpenoiden Harzsäuren bietet die Arbeit von Zinkel [90], die bis heute als Grundlage zur Identifizierung von Harzsäuren herangezogen wird.

## 4 Vergleichsexperimente mit Kiefernharz

Unabhängig von der Extraktion und der Pyrolyse von Bernsteinproben wurde Kiefernharz als Vergleichsmaterial analysiert. Die Intention war, über mögliche Polymerisationswege Aufschluß zu erhalten. Dazu wurden mit Kiefernharz mehrerer Versuche im Autoklaven unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt:

1. Zuerst wurde das Kiefernharz in Dichlormethan vollständig gelöst und mit Diazomethan derivatisiert. Anschließend wurde diese Lösung gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert, um die Inhaltsstoffe des Harzes festzustellen.

2. Eine weitere Probe des Harzes wurde 19 Stunden mit einer UV-Lampe (450 W) bestrahlt. Eine geringe Menge wurde analysiert. Der restliche Teil wurde autoklaviert.

3. Drei weitere Proben wurden unter verschiedenen Bedingungen im Autoklaven experimentell behandelt. Die Bedingungen im Autoklaven sind folgende:

Probe 7: 1 Monat, 100 bar, 70°C

Probe 8: 1 Monat 50 bar, 70°C

Probe 10: 3 Monate 100 bar, 50°C, vorher mit 450 W bestrahlt

Probe 13: 1 Monat 300 bar, 50°C

Die Proben wurden anschließend in Dichlormethan gelöst und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert.

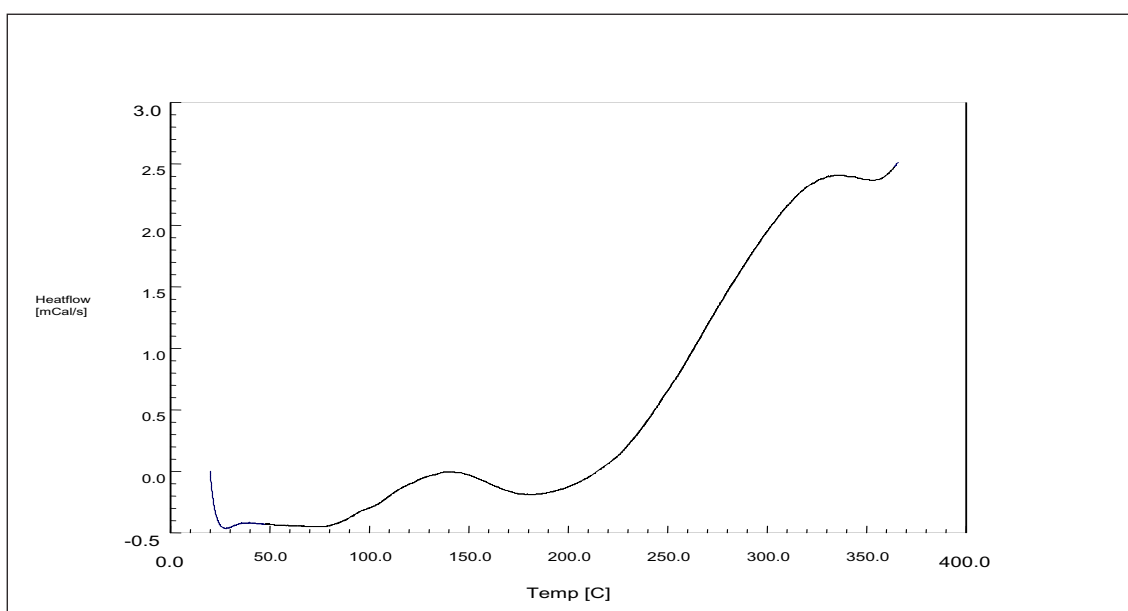
4. Um einen möglichen Einfluß der Mikrowellenstrahlung während einer Extraktionsphase festzustellen, wurde etwas Kiefernharz in Dichlormethan unter den gleichen Bedingungen wie die Bernsteinproben mit der Mikrowelle behandelt und anschließend analysiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Pyrolyse

#### 5.1.1 Py-GC-MS

Die Pyrolyse der Bernsteinproben hat das Ziel, Analysenaufschlüsse über die gesamte Matrix zu erhalten, um so Rückschlüsse auf das (die) für die Polymerisation entscheidende(n) Monomer(e) ziehen zu können. Die Ergebnisse der Pyrolyse sind sehr komplex. Wie der Chromatogrammvergleich der Probe 6 bei unterschiedlichen Temperaturen (Seite 27) zeigt, scheint eine Pyrolysetemperatur von 500°C am besten geeignet zu sein. Bei 400°C ähnelt das Chromatogramm sehr den Ergebnissen aus der Mikrowellenextraktion (Seite 34, Abb. 11). Die eigentliche Matrix scheint bei dieser für eine Pyrolyse recht niedrigen Temperatur noch nicht vollständig zersetzt zu werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse bei einer Pyrolysetemperatur von 600°C. Hier ist eine weit fortgeschrittene Zersetzung der Matrix in kleinere Bruchstücke zu beobachten. Um abschließend einen Hinweis auf den Schmelzbereich des Bernsteins zu erhalten, wurde die Probe mit einem *Differential Scanning Calorimeter* (DSC) analysiert. Aus der Literatur sind Bernsteinuntersuchungen mittels DSC bekannt [91]. Diese zeigen einen Schmelzbereich für Bernstein zwischen 400 und 450 K an. Bei der DSC-Analyse der Probe 6 konnte dagegen kein Schmelzbereich festgestellt werden. Stattdessen wurde eine kontinuierliche Zersetzung der Probe beobachtet

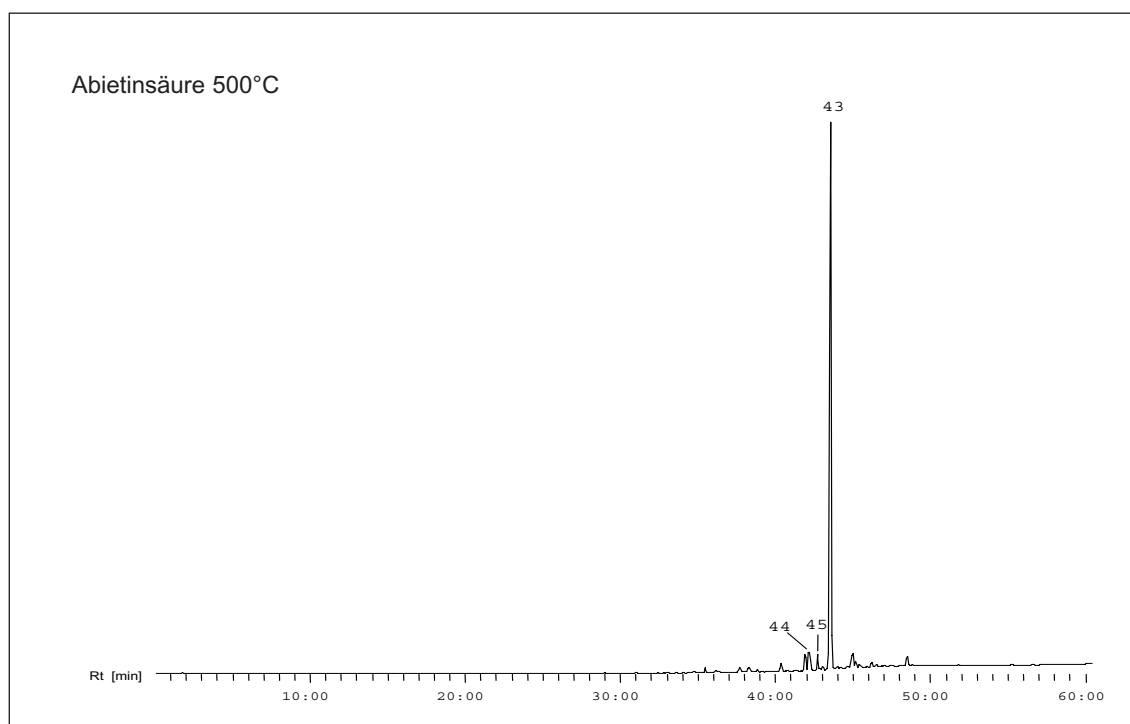


**Abb. 16** DSC der Probe 6

(Abbildung 16). Die Probe lag nach der Messung schwarz kristallin vor. Da weiterhin in der Literatur die Harzsäuren als die entscheidenden polymerisierenden Monomere beschrieben sind, wurden einige Harzsäuren pyrolysiert. Es handelt sich um folgende diterpenoide Säuren:

- 7,3-Abietinsäure (**11**)
- Dehydroabietinsäure (**18**)
- 8,15-Pimarsäure (**24**)
- Isopimarsäure (**23**) mit geringen Verunreinigungen von Sandaracopimarsäure (**22**)
- Pallustinsäure (**20**)

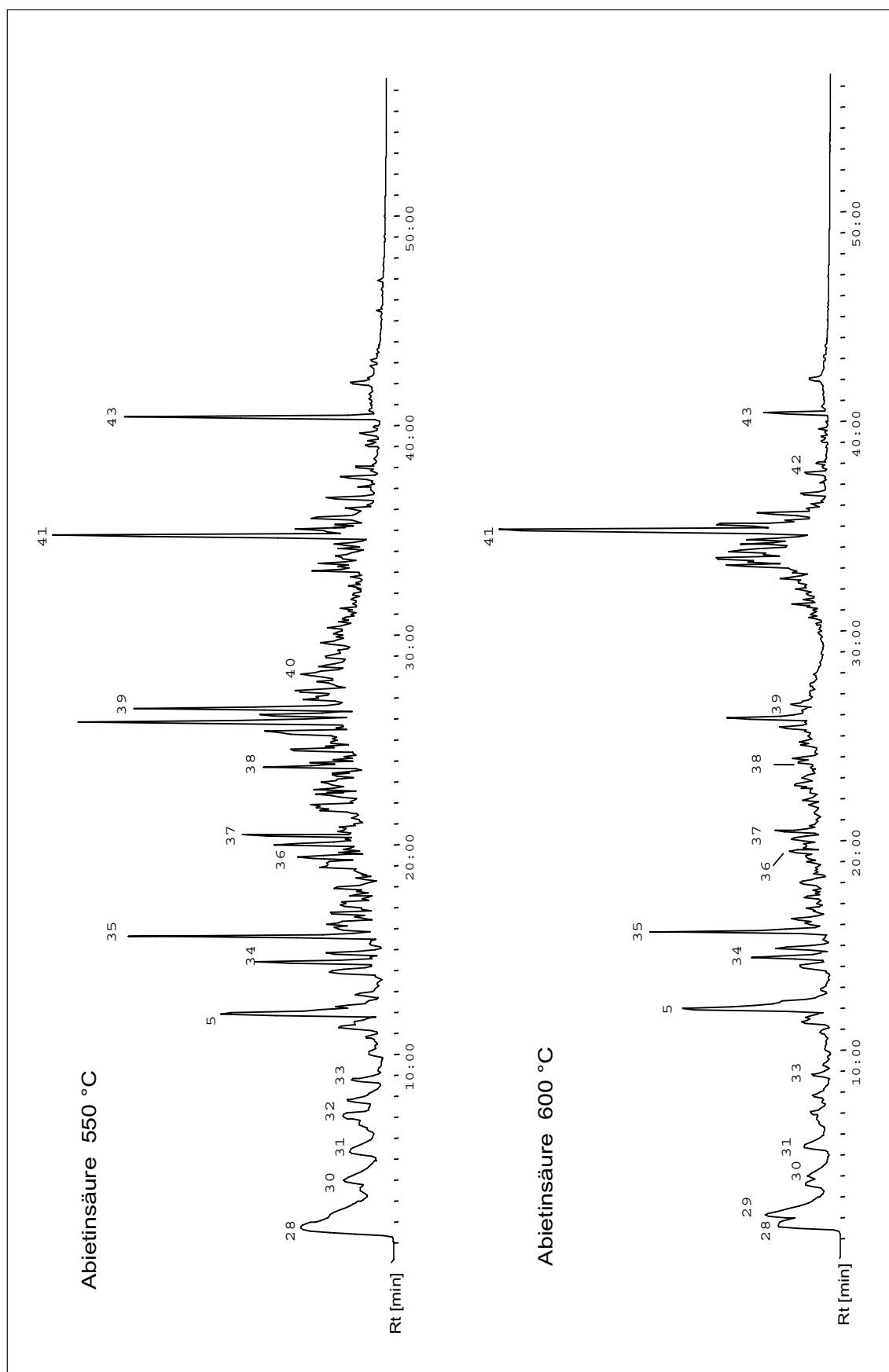
Die Pyrolysetemperaturen betrugen 500°C, 550°C und 600°C. Erstaunlicherweise tritt bei der Temperatur von 500°C keine Zersetzung der Harzsäuren auf, wie am Beispiel der Abietinsäure festgestellt wurde (Abbildung 17). Es findet sich ein scharfer Peak (43). Nach dem Massenspektrum liegt die Säure als Methylester vor. Die Harzsäuren scheinen daher thermisch stabiler zu sein, als die Struktur es vermuten lässt.



**Abb. 17:** Pyrolysechromatogramm der Abietinsäure bei 500°C

Bei der Pyrolysetemperatur von 550°C zeigen sich einige Zersetzungsprodukte,



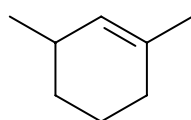


**Abb. 18** Pyrolysechromatogramme der Abietinsäure bei verschiedenen Temperaturen

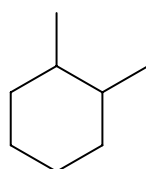
konnten folgende Substanzen identifiziert werden (Tabelle 6):

**Tab. 6:** Identifizierte Pyrolyseprodukte der Abietinsäure

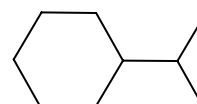
Nr.	Verbindung
28	Kohlendioxid
29	Ameisensäureethylester
30	Toluol
31	1,3-Dimethylcyclohexen
32	o-Xylol
33	o-Cumol
5	p-Cumol
34	1-Ethyl-4-isopropylbenzol
35	1-[(E)-2-Methyl-1-butenyl]benzol
36	3-Methyl-1,2-dihydronaphthalin
37	1-Methylnaphthalin
38	2-Isopropylnaphthalin
39	7-Isopropyl-1-methylnaphthalin
40	1,5-Dimethyl-4-isopropylnaphthalin
41	4-H,19-Norabieten-7,13-dien
42	6-Dehydroabietin
43	7,13-Abietinsäuremethylester
44	Dehydroabietinsäuremethylester
45	Pallustrinsäuremethylester



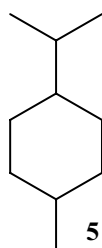
31



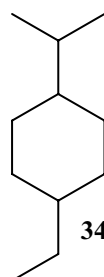
32



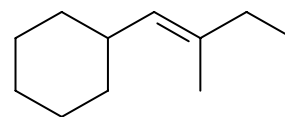
33



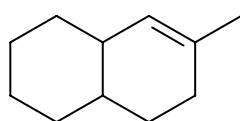
5



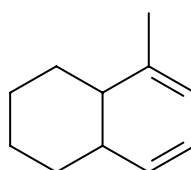
34



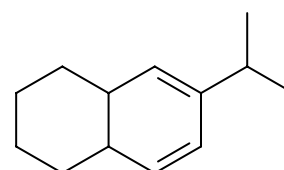
35



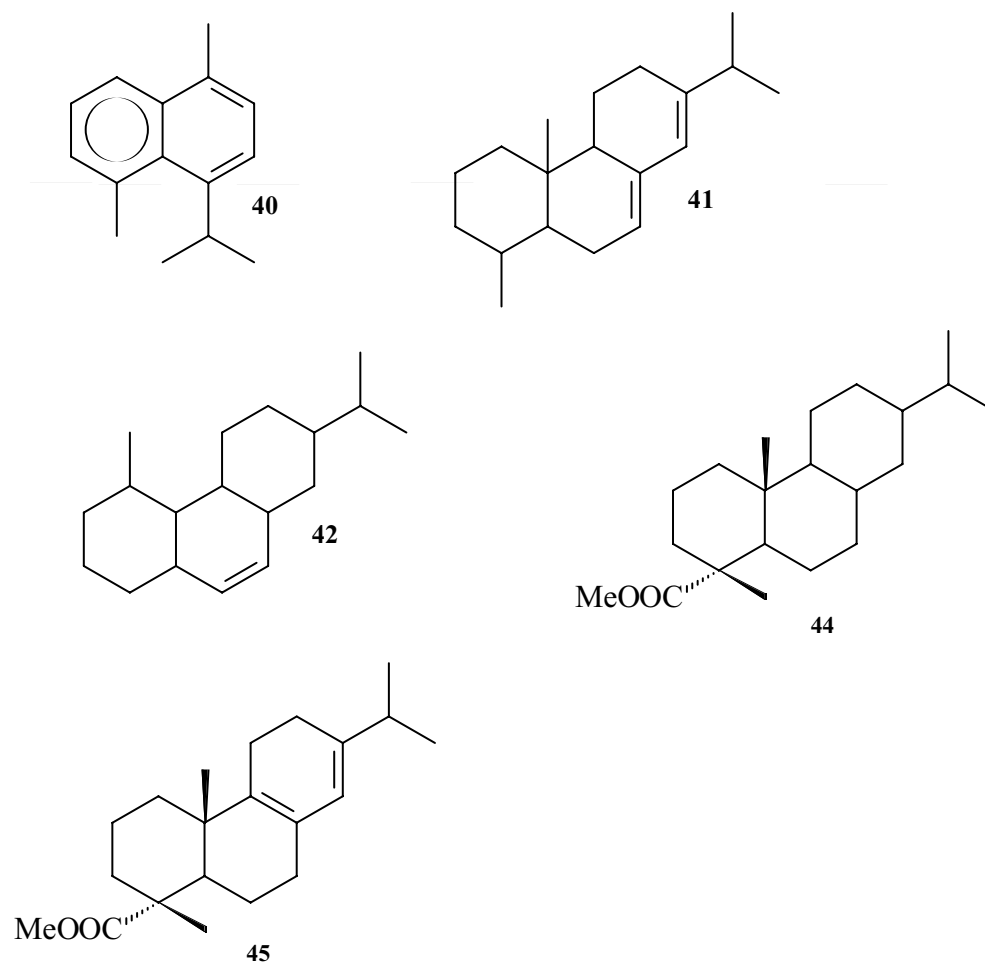
36



37

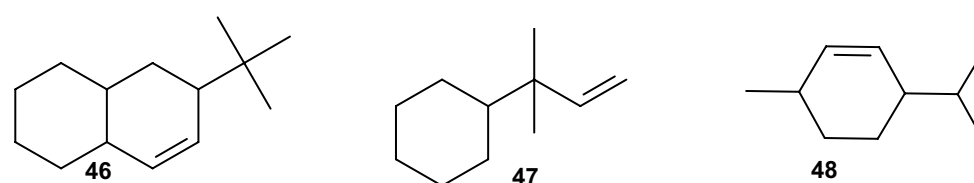


38



die bei höheren Temperaturen weiter zunehmen (Abbildung 18). Im einzelnen Der Vergleich der unterschiedlichen Harzsäuren miteinander zeigt, daß zwischen dem Abietan- und dem Pimarantyp nach der Pyrolyse keine Unterscheidung mehr möglich ist (Abbildung 19). Bei der Dehydroabietin- und Isopimarsäure konnte noch 2-tert-Butyl-1,2-dihydronaphthalin (**46**), bei der Pallustrinsäure 1,1-Dimethylallylbenzol (**47**) und bei den Pimaransäuren 3-Isopropyl-6-methylcyclohexen (**48**) identifiziert werden.

Die denkbaren Zerfallsprodukte (**49**) oder (**50**) für die Pimarsäuren konnten nicht gefunden werden. Anscheinend finden mehrere Umlagerungen der Methyl- und Ethylengruppen statt. Desweiteren scheint die Isopropylgruppe während des Pyrolyseprozesses eine stabile Molekülgruppe darzustellen, die bevorzugt gebildet wird.



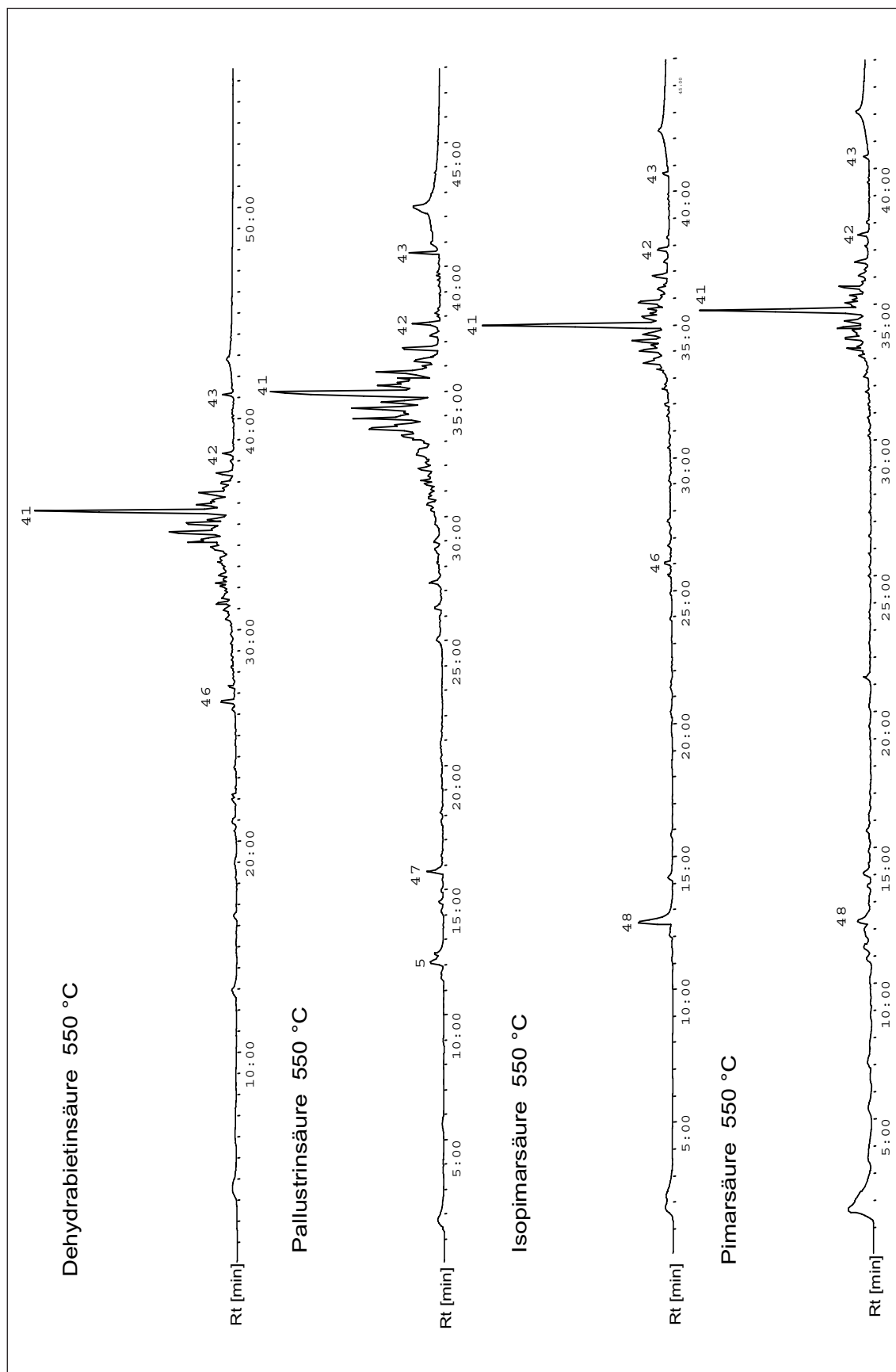
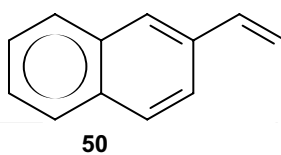
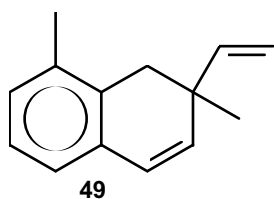
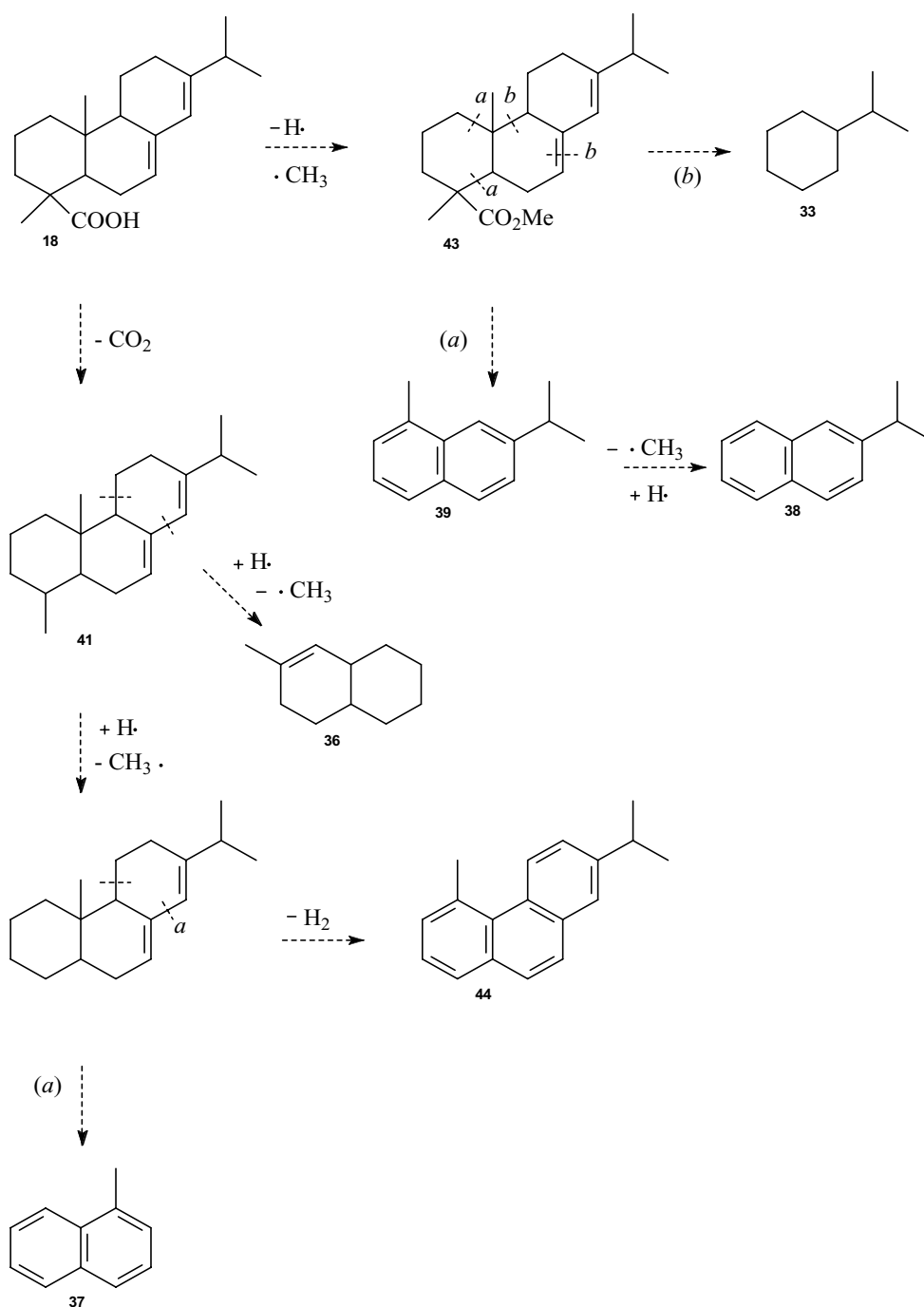


Abb. 19: Pyrolysechromatogramme der Harzsäuren



(angenommene Zersetzungsprodukte der Pimarsäuren)

Demnach werden die Harzsäuren unter Ringspaltung und anschließender Aromatisierung möglicherweise zersetzt:



Die Harzsäuren wurden auch mit der Absicht pyrolysiert, ihre Zersetzungsprodukte in den Bernsteinproben wiederzufinden und dadurch Pyrolyseprodukte des Bernsteines identifizieren zu können. Diese Verbindungen konnten in den Pyrolyseprodukten der Bernsteinproben (Kernstücke) nicht wiedergefunden werden. Entweder liegen sie in zu geringen Mengen vor und verlieren sich daher im Untergrund, oder der Anteil der Harzsäuren am Polymer ist nicht so hoch, wie bislang angenommen wurde.

Es spricht nach diesen Ergebnissen einiges dafür, daß weder die Abietinsäure als Dimer (**12**) noch die Agathicsäure (**16**) und die Cummunicsäure (**17**) als die entscheidenden Monomere für den Aufbau des Bernsteines verantwortlich sind. Für die Identifizierung der Inhaltsstoffe im Bernstein ist nicht nur die Temperatur ausschlaggebend, sondern auch die Injektorart des Gaschromatographen (siehe Seite 23). Da die Hersteller bislang nicht in der Lage war, einen geeigneten Adapter für die Kopplung des Pyrojectors mit dem PTV-System zu liefern, war es leider nicht möglich, sämtliche Proben mit Hilfe des KAS-Systems zu pyrolysieren. Der bisher vorliegende Adapter sorgte für einen zu hohen Luftanteil im Massenspektrometer, was zu einer Verglühung des Filaments führen kann. Daher mußte weitestgehend auf das normale Split/splitless-System für die Pyrolyse der meisten Proben zurückgegriffen werden.

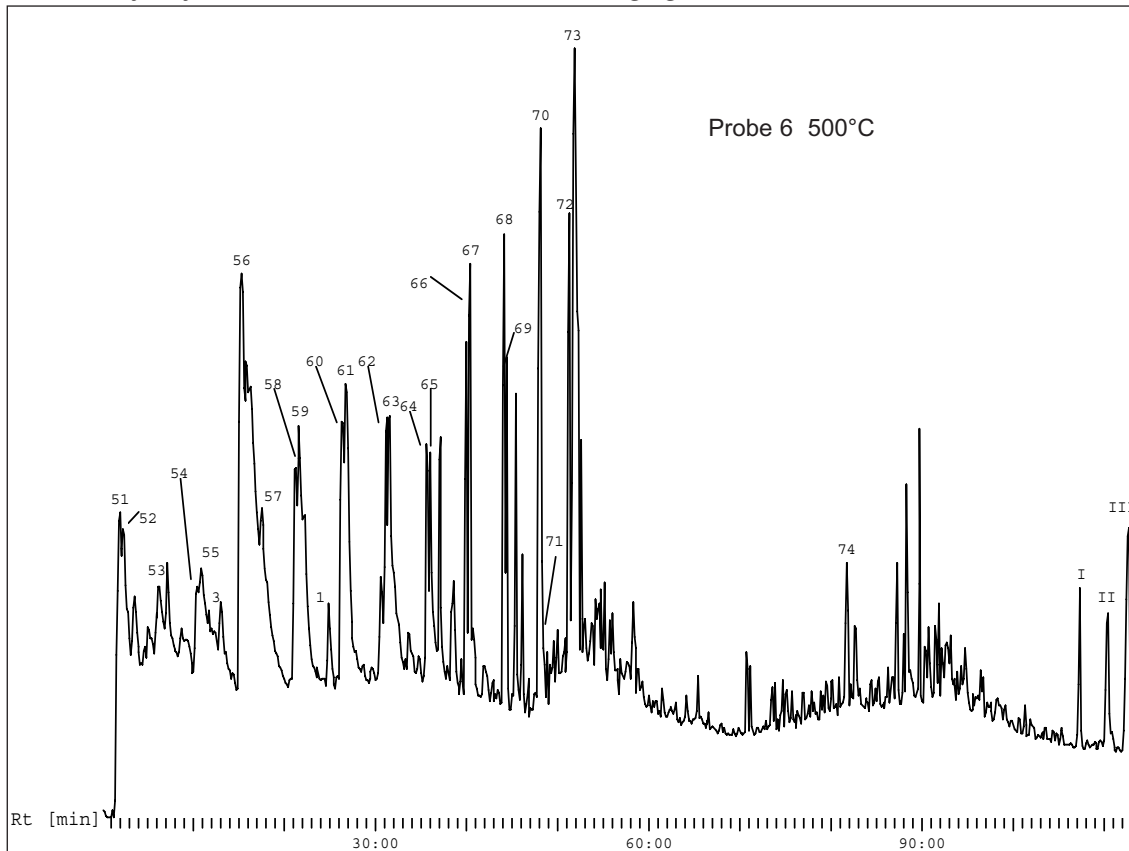
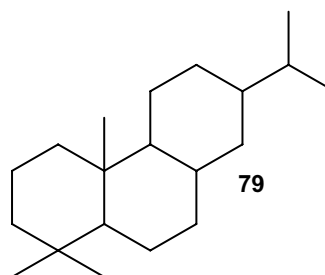
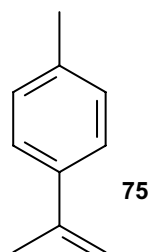


Abb. 20: Pyrolysechromatogramm mit einem PTV-Injektor

Bei der Pyrolyse - gekoppelt mit dem *PTV*-Aufgabesystem - konnten in einer Bernsteinprobe folgende Verbindungen identifiziert werden (Tabelle 7) [92, 93, 94, 95]:

**Tab. 7:** Identifizierte Pyrolyseverbindungen

Nr.	Name
51	2-Methylbuten
52	1-Hexen
53	1-Octen
54	1-Nonen
55	Nonan
4	Camphen
56	Methylstyrol
57	1-Propenylbenzol
58	1-Undecen
59	Undecan
1	Borneol
60	1-Dodecen
61	Dodecan
62	1-Tridecen
63	Tridecan
64	1-Tetradecen
65	Tetradecan
66	1-Pentadecen
67	Pentadecan
68	1-Hexadecen
69	Hexadecan
70	1-Octadecen
71	Octadecan
72	1-Nonadecen
73	Nonadecan
74	Tetracosan
75	p-Isopropenyltoluol
76	1-Heptadecen
77	Eicosanol
78	Bernsteinsäuredimethylester

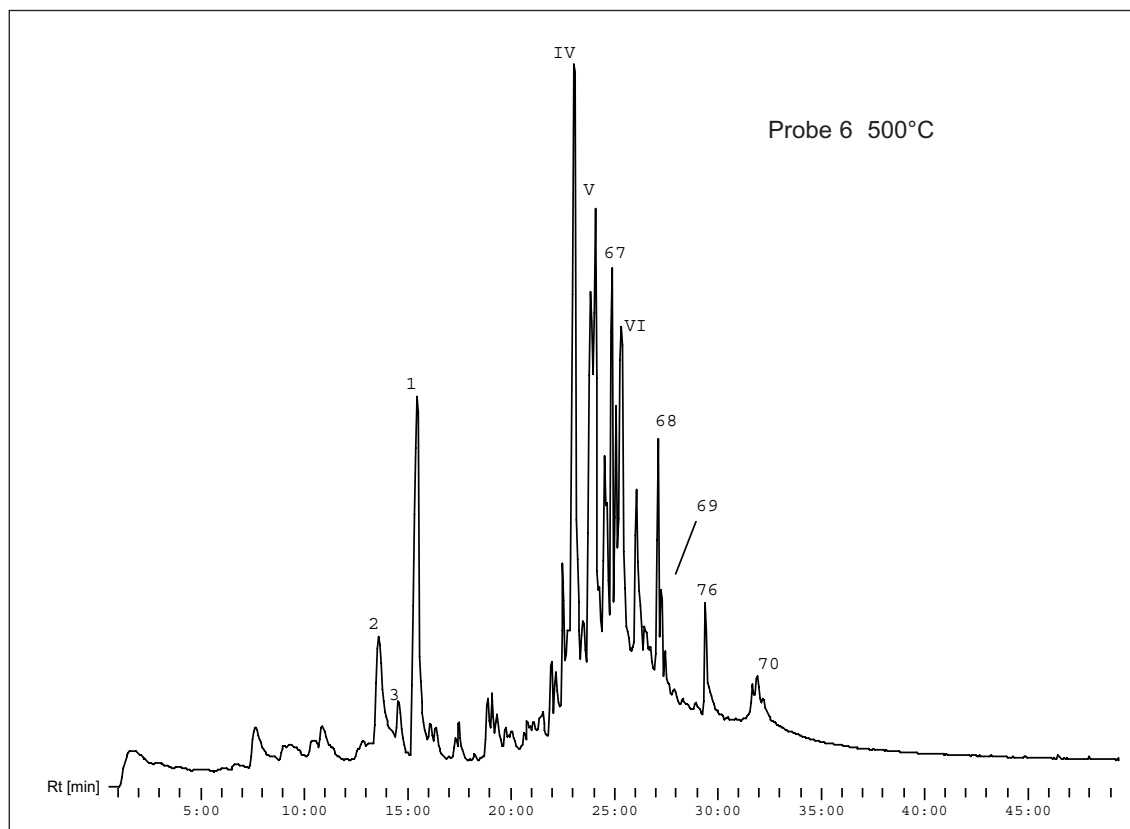


Neben den Alkan- und Olefinhomologen wurden mit diesem Pyrolyse-GC-MS-System auch Verbindungen mit Massenionen über 600 amu detektiert. Diese Verbindungen I bis III (Spektren siehe Anhang) konnten mit den vorliegenden Datenbanken nicht identifiziert werden:

(I)  $M^+$ : 668; B 179

(II)  $M^+$ : 684; B 193

(III)  $M^+$ : 668; B 179



**Abb. 21:** Pyrolysechromatogramm mit einem Split/splitless-Injektor

Anders liegen dagegen die Ergebnisse, bei denen die Pyrolyseprodukte über einen Split/splitless-Injektor auf die Kapillarsäule geleitet wurden. In diesen Chromatogrammen (Abbildung 21, 22) konnten nur wenige Zersetzungsprodukte zugeordnet werden. Einige Hauptverbindungen **IV** bis **VI** (Spektren siehe Anhang) konnten nicht identifiziert werden:

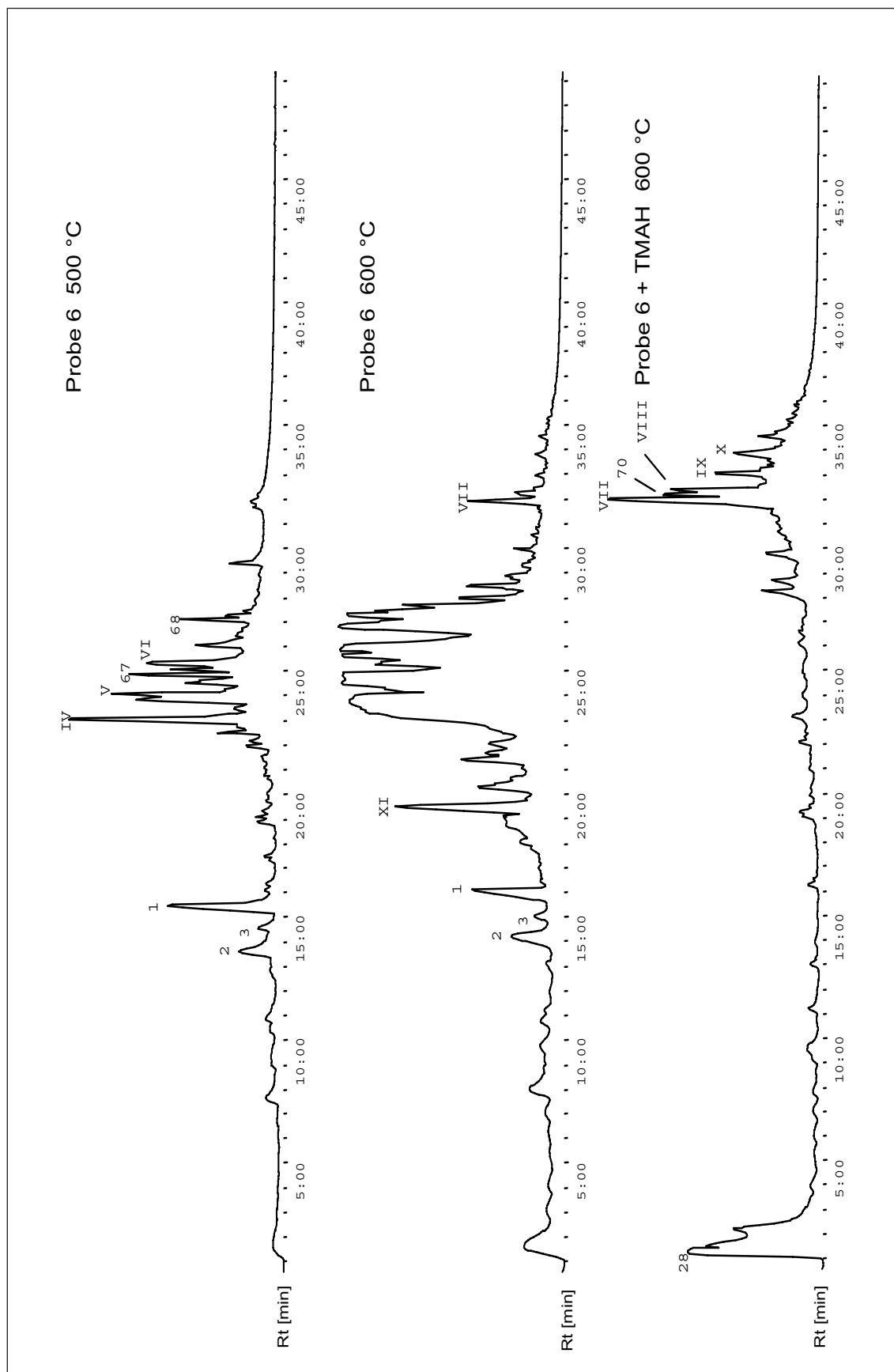
**(IV)**  $M^+$ : 190; B 95

**(V)**  $M^+$ : 202; B 119

**(VI)**  $M^+$ : 202; B 119

Die Derivatisierung der Proben mit TMAH zeigt eine Zunahme der Peaks im höhersiedenden Bereich bei gleichzeitiger Abnahme von zuvor eluierenden Verbindungen (Abbildung 22). Die Spektren (siehe Anhang) zu diesen methylierten Substanzen konnten jedoch keiner Harzsäure eindeutig zugeordnet werden:





**Abb. 22:** Pyrolysechromatogramm der Probe 6 unter verschiedenen Bedingungen

(VII)  $M^+$ : 246; B 95

(VIII)  $M^+$ : 258; B 91

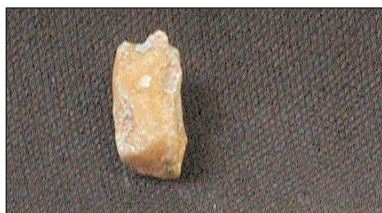
(IX)  $M^+$ : 258; B 131

(X)  $M^+$ : 272; B 91

(XI)  $M^+$ : 190; B 163

Ein weiteres Ziel war es, über die Pyrolyse Unterschiede zwischen der Kruste und den Kernstücken herauszufinden. Für die Verwitterung der Kruste werden, wie schon erwähnt, oxidative Prozesse verantwortlich gemacht. Es ist daher zu erwarten, daß bei der Pyrolyse der Krusten verstärkt sauerstoffhaltige Zer-setzungsprodukte im Vergleich zu den Kernstücken zu finden sind. Da die Pyrolysebedingungen unter Sauerstoff-

ausschluß stattfanden, sind bei der Verbrennung der Proben im Pyrojector Reaktionen mit Luftsauerstoff und somit eine Verfälschung der Ergebnisse aus-



**Abb. 24:** Photo der Probe 11  
Verwitterungskruste

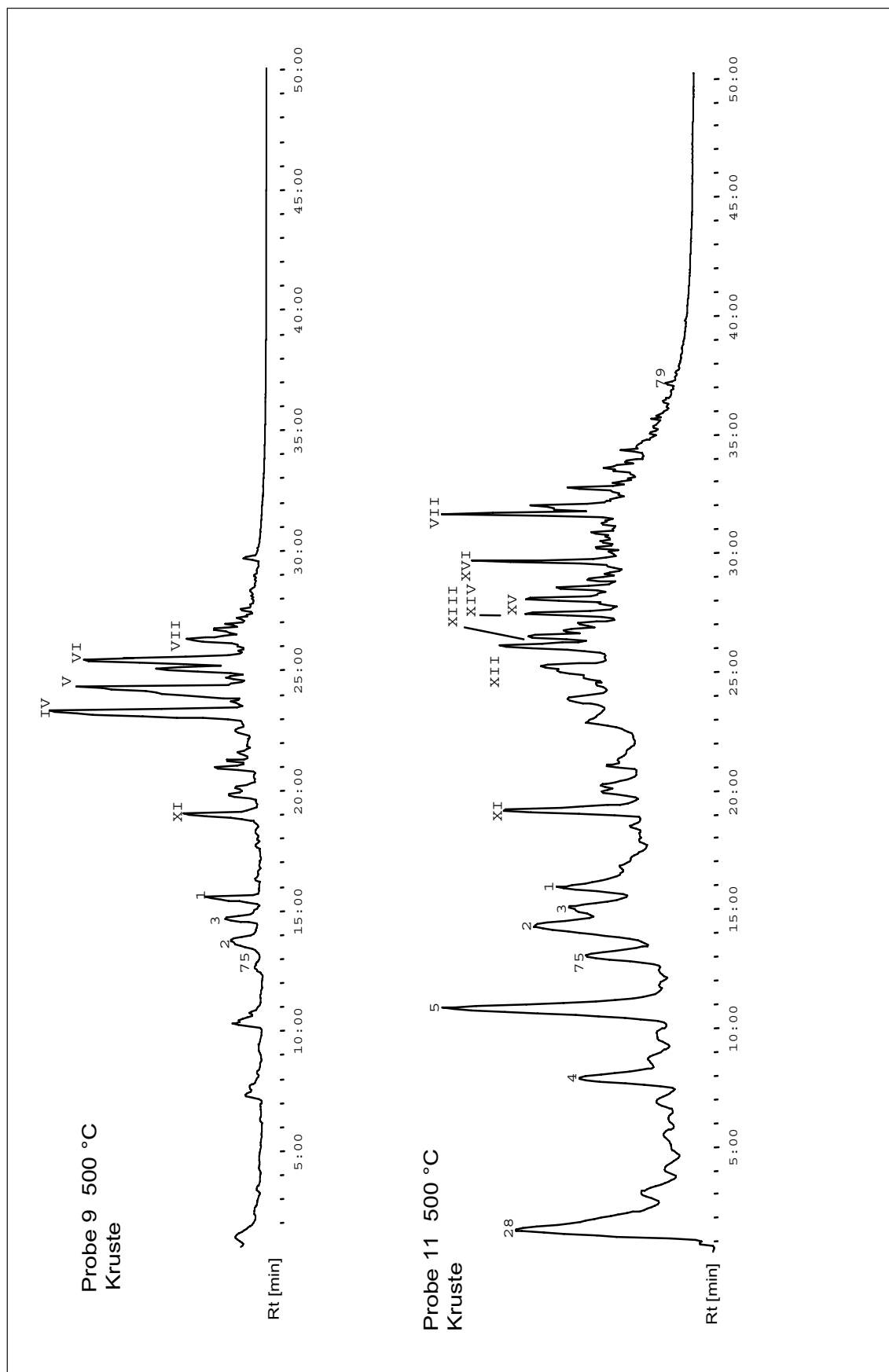


**Abb. 23:** Photo der Probe 9, Kernseite

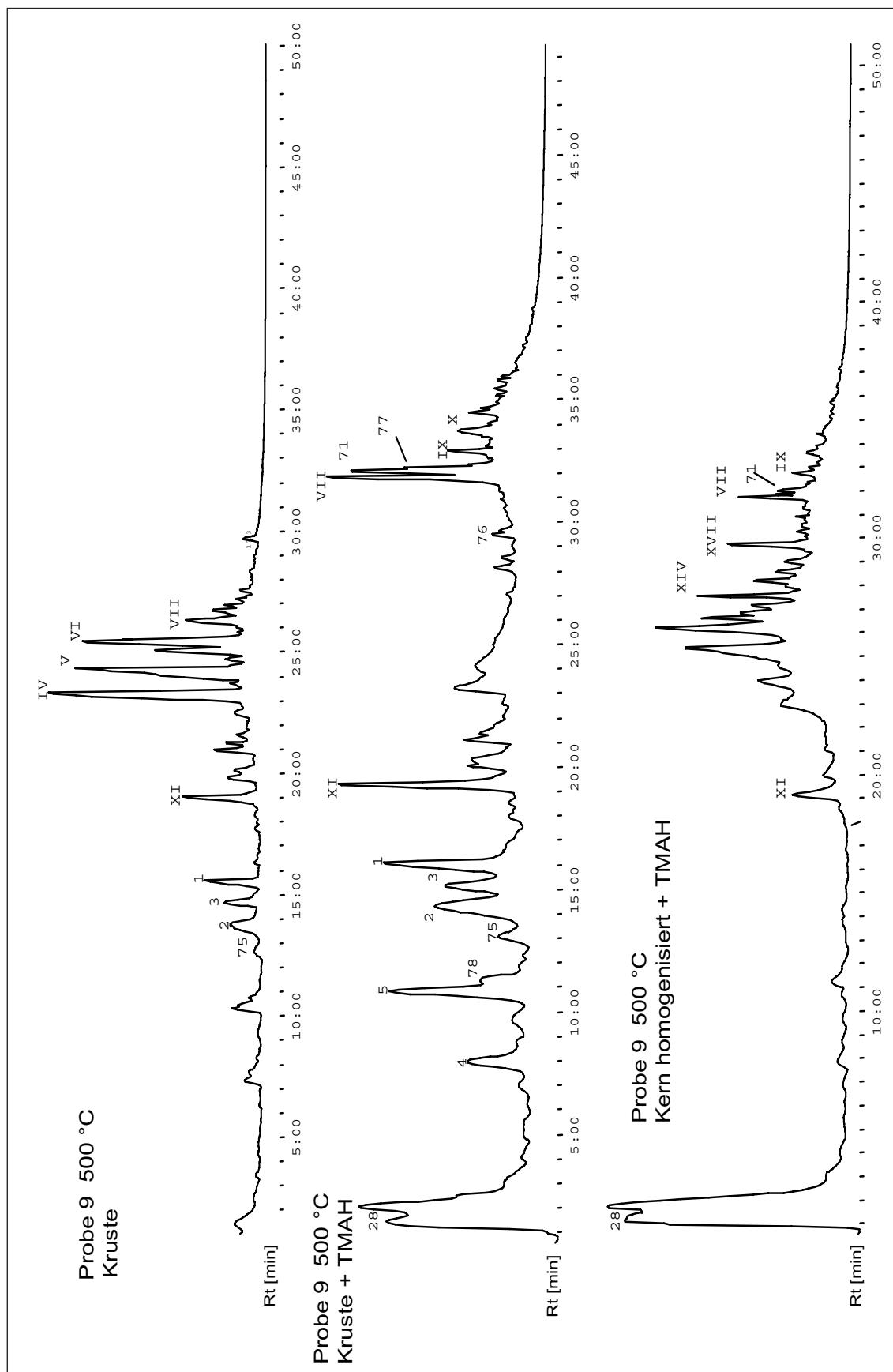
zuschließen. Wie der Vergleich der Chromatogramme zwischen den Krusten (Abbildung 26) und den Kernstücken zeigt (Abbildung 27), sind die Unterschiede nur minimal. Auffällig ist die quantitativ deutliche Zunahme der Monoterpene Camphen (4), Fenchol (2), Campher (3) und Borneol (1).

Einige geringfügige Unterschiede, besonders in der quantitativen Zusammensetzung, treten aber auch schon innerhalb der Kernstücke auf. So ist die Probe P9 nicht homogen zusammengesetzt (Abbildung 23). Neben einer starken Verwitterungskruste kommen innerhalb des Kernes milchig-orange wie auch klar-orangegelbe Bereiche vor.

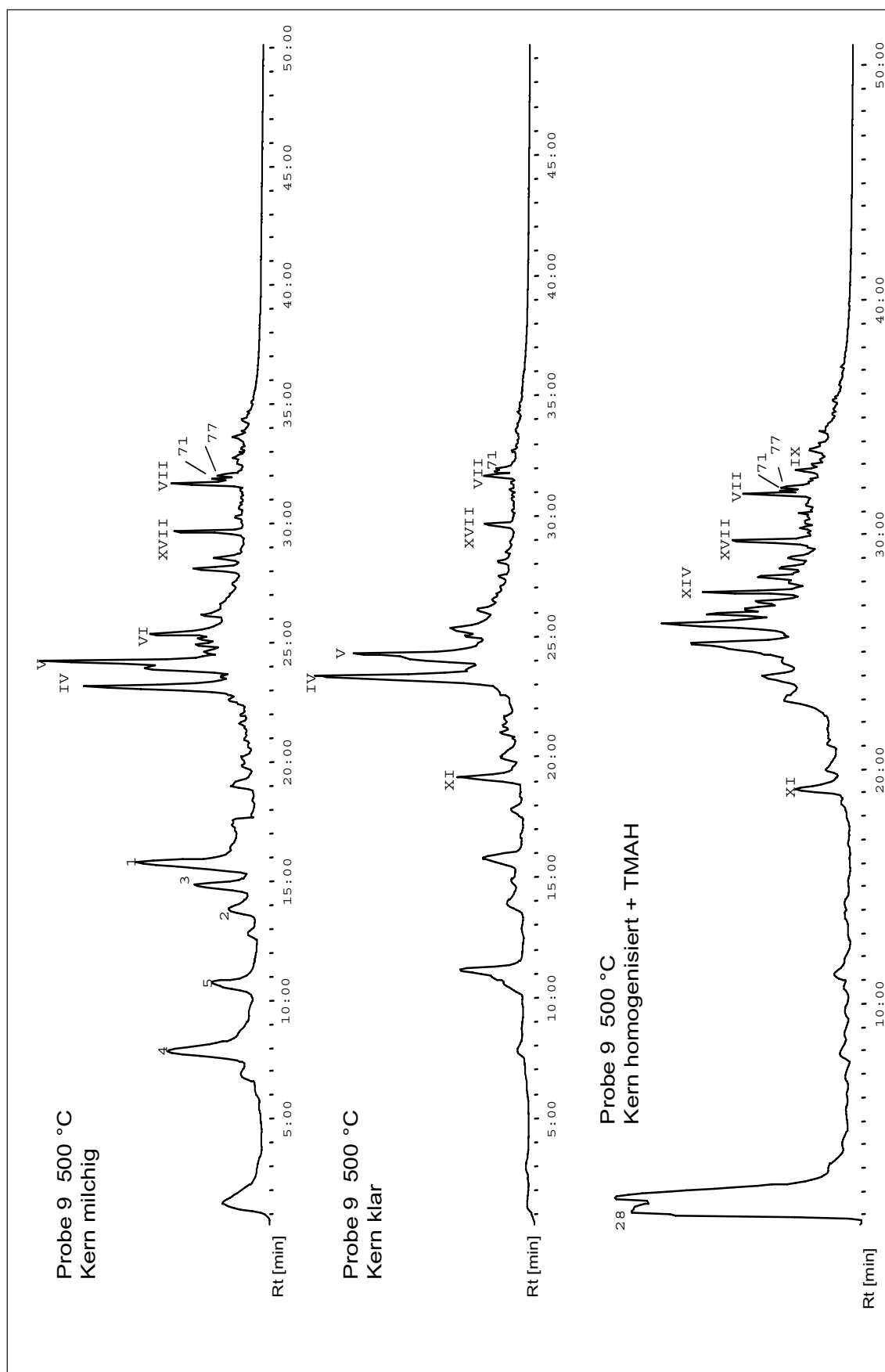
Wie die Chromatogramme (Abbildung 28) zeigen, treten zwischen den milchigen und den klaren Bereichen ebenfalls einige, wenn auch sehr geringe Unterschiede auf:



**Abb. 26:** Chromatogramme der Krusten P9 und P11



**Abb. 27:** Vergleich der Kruste mit dem Kern, beides Probe 9



**Abb. 28:** Chromatogramme aus unterschiedlichen Kernbereichen der Probe 9

Auch hier konnten folgende Hauptverbindungen **XII** bis **XVII** nicht eindeutig zugeordnet werden (Spektren siehe Anhang):

**Kruste P11:**

(**XII**) M+: 218; B 91

(**XIII**) M+: 216; B 91

(**XIV**) M+: 216; B 157

(**XV**) M+: 232; B 177

(**XVI**) M+: 220; B 119

**Probe 9 Kern:**

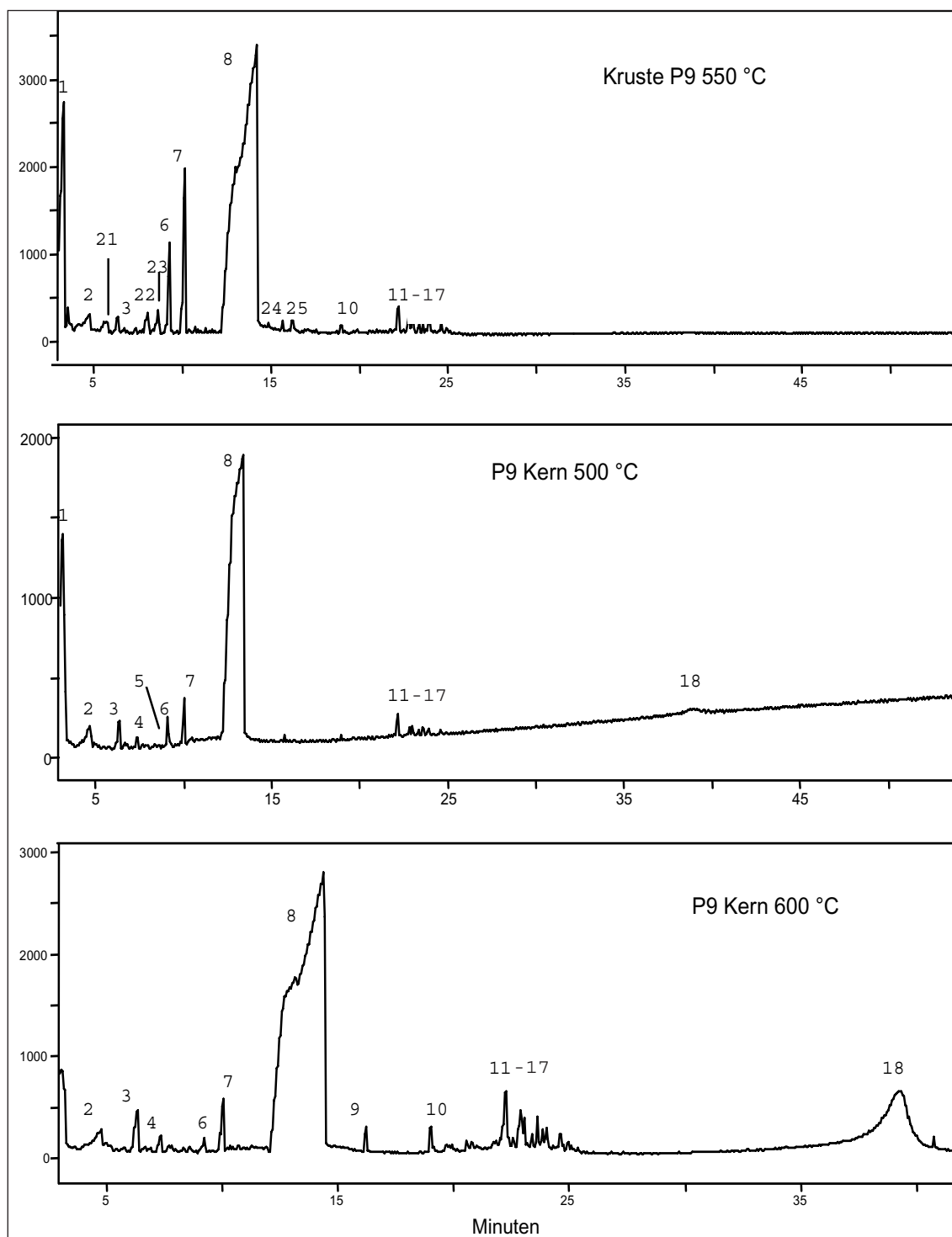
(**XVII**) M+: 218; B 119

Für eine eindeutige Interpretation der Pyrolyseergebnisse ist daher eine systematische Durchführung der Pyrolyse mit einer statistisch relevanten Menge an Probenmaterial sinnvoll.

### 5.1.2 Py-GC-FTIR

Da sich zwischen den Kernstücken und den Krusten über die Py-GC-MS-Methode nur bedingt Unterschiede feststellen lassen, wurden die jeweiligen Proben (ca. 30 mg) mit einem Pyrolyse-GC-FTIR-System analysiert. Hier zeigte sich ein etwas modifiziertes Ergebnis (Abbildung 29). Die Ursachen liegen in verschiedenen Responsefaktoren und unterschiedlichen UV-Aktivitäten der einzelnen Verbindungen.

Durch die Aufnahme der Infrarotspektren in einer Gasphase kommt es zu Verschiebungen der charakteristischen Banden, für deren Auswertung spezielle Datenbanken benötigt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit nur eine kleine Datenbank <sup>[96]</sup> vorlag, konnten nur wenige Spektren (**IP 1-25**) eindeutig mit bekannten Substanzen in Verbindung gebracht werden (soweit nicht anders dargestellt, befinden sich die IR-Spektren im Anhang):



**Abb. 29:** Py-GC-FTIR-Chromatogramme der Probe 9 (30 mg)

**IP 1** Carbonsäure, vermutlich Essigsäure

**IP 2** Säure:  $3579\text{ cm}^{-1}$  (OH-Schwingung),  $1781\text{ cm}^{-1}$  (Carbonylschwingung)  
 $1761\text{ cm}^{-1}$  (Methylester)

**IP 3** Alkan, vermutlich Hexan

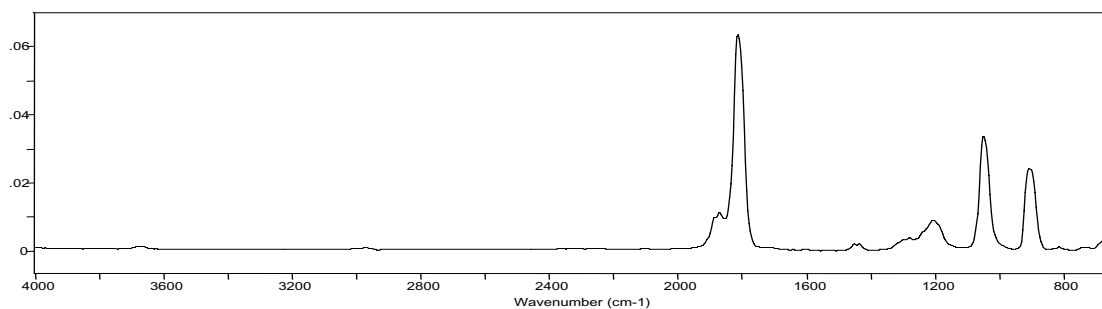
**IP 4** Alkan, vermutlich Heptan

**IP 5** vermutlich 4-Hydroxylactonbutansäure

**IP 6** Aromat:  $2969\text{ cm}^{-1}$  (arC-H),  $2888\text{ cm}^{-1}$  (CH-Schwingung)

**IP 7** Verzweigtes Alken: vermutlich 2,3-Dimethyl-1-hexen

**IP 8** Bicyclische Carbonylverbindung (Spektrum Abbildung 30)



**Abb. 30:** unbekanntes Spektrum der Verbindung IP 8

**IP 9** Carbonylverbindung,  $1781\text{ cm}^{-1}$

**IP 10** Cyclische Alkanverbindung,  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  (CH-Schwingung)

**IP 11-17** Aromatische und Alkanverbindungen

**IP 18-20** Harzsäuren (Abbildung 31)

**IP 21** Aldehyd oder Ester:  $2892\text{-}2969\text{ cm}^{-1}$  (CH-Schwingung),  $1742\text{ cm}^{-1}$  (C=O-Schwingung)

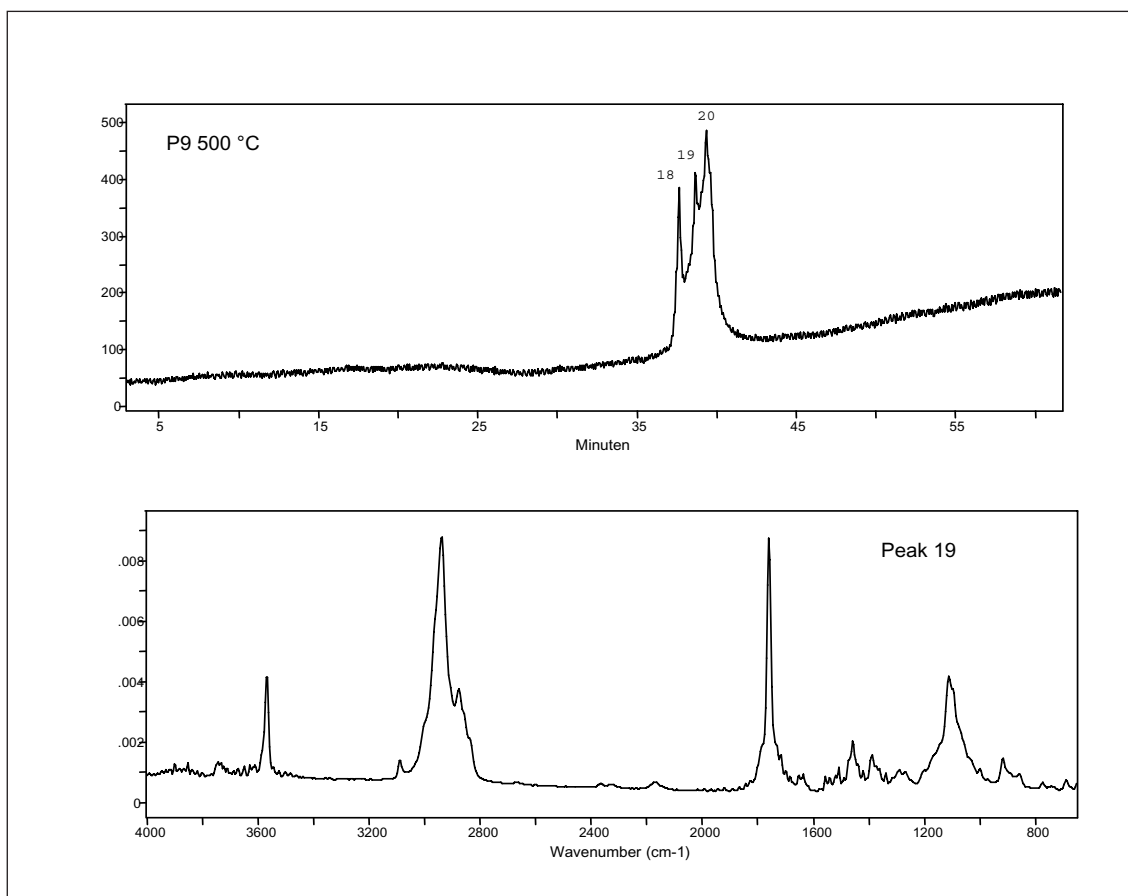
**IP 22** Aromat:  $3070\text{ cm}^{-1}$  (arC-H),  $2961\text{ cm}^{-1}$  (CH),  $2877\text{ cm}^{-1}$

**IP 23** Alkan,  $3093\text{ cm}^{-1}$  (CH-Schwingung)



**IP 24** Aldehyd oder Ester: 2969 cm<sup>-1</sup> (CH), 1757 cm<sup>-1</sup> (C=O-Schwingung)

**IP 25** Borneol



**Abb. 31:** Chromatogramm der Kernprobe P9 (2 mg); IR-Spektrum einer Harzsäure

Die FTIR-Chromatogramme zeigen für den Krustenbereich eine deutlich Zunahme der Verbindungen **IP 6** und **7**. Weiterhin treten in geringem Umfang neue Carbonylverbindungen auf. Oxidationsprozesse scheinen demnach keine wesentliche Rolle im Verwitterungsprozeß zu spielen.

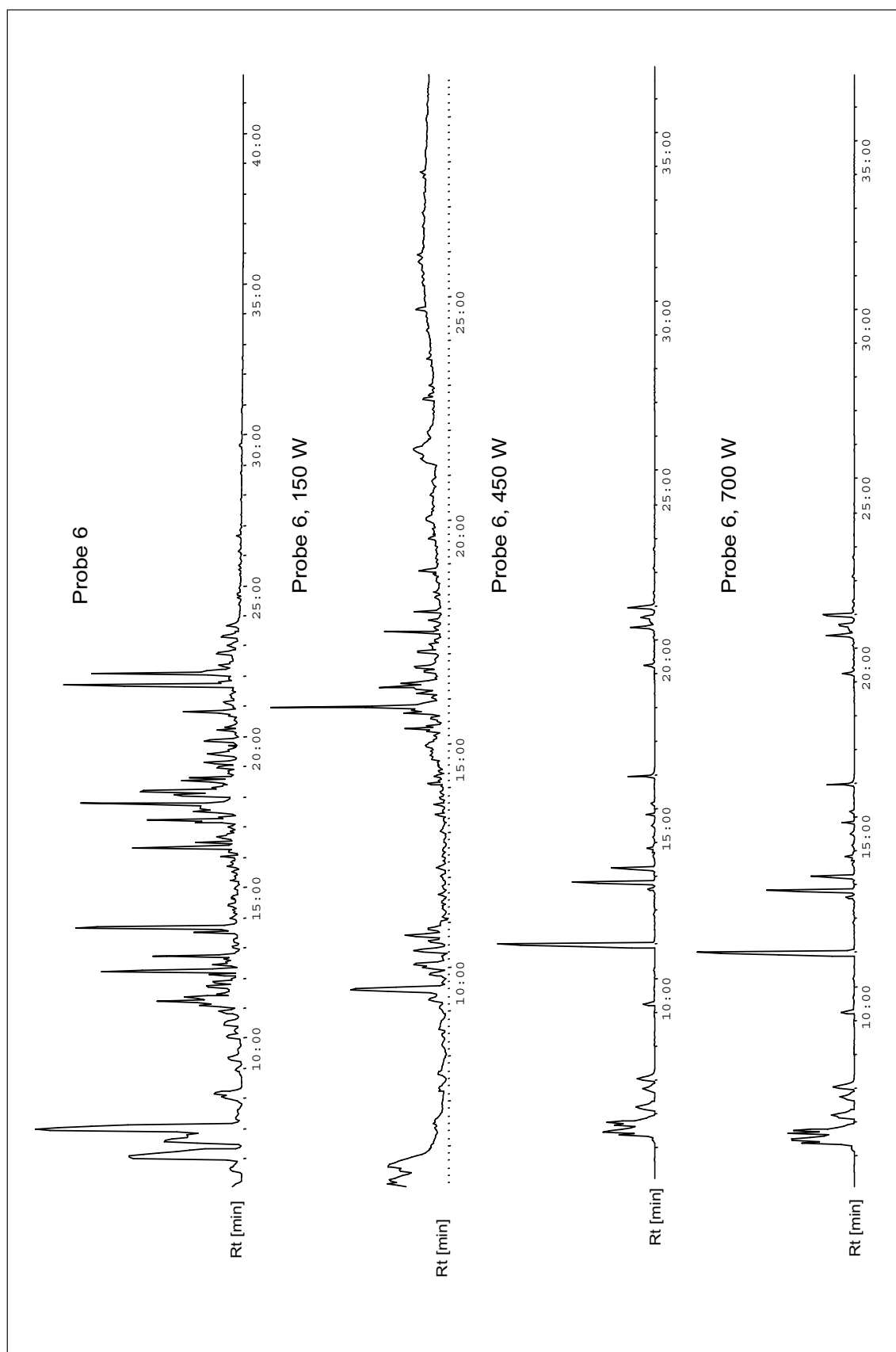
Auffällig ist das Fehlen der Harzsäuren. Stattdessen läßt sich das Spektrum von Borneol wiederfinden, welches in den Kernproben fehlt. Dies unterstützt die Beobachtung der quantitativen Zunahme der Monoterpenanteile bei den Pyrolyse-gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchungen. Vermutlich liegen die Monoterpene im Polymer Bernstein als Bausteine eingebunden vor und verwittern an der Oberfläche heraus. Das Fehlen der Harzsäuren kann mit fortschreitenden Abbauprozessen erklärt werden.

## 5.2 Photochemische Degradation

Wie die Chromatogramme (Abbildung 32) zeigen, nehmen die löslichen Anteile mit zunehmender Bestrahlung deutlich ab. So finden sich bei den intensiven Bestrahlungsversuchen mit einer 450 W- bzw. 700 W-Lampe nur noch 1,2,4-Trimethylbenzol und Xylol als Hauptbestandteil wieder. Bei der schwächeren Bestrahlung kann kaum ein Unterschied zur unbestrahlten Probe festgestellt werden. Der Versuch, durch die Bestrahlung größere Komplexe aus der Oberfläche der Matrix herauszulösen und auf diese Weise das Polymer durch langfristige Bestrahlungszeiten zu zerstören, wie es aus der Polymerdegradation in der Kunststoffchemie [68] bekannt ist, war nicht erfolgreich. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß bei intensiver Bestrahlung sehr kleine, gasförmige Moleküle aus der Oberfläche herausgelöst werden. Diese können mit dem permanenten Stickstoffstrom, der durch die Versuchsanordnung geleitet wird, entweichen. Viel wahrscheinlicher erscheint es jedoch, daß der gegenteilige Prozeß einer zunehmenden Vernetzung im Polymer erreicht wird, aus dem sich keine Verbindungen mehr herauslösen lassen.

## 5.3 Säulenchromatographische Fraktionierung

Der Versuch, säulenchromatographisch über verschiedene stationäre Phasen eine Trennung der einzelnen Stoffkomponenten zu erreichen, war nur zum Teil erfolgreich. Zum einen konnte eine zunehmend starke chemische Affinität der zu trennenden Stoffe bei Erhöhung des stationären Phasenanteils beobachtet werden, so daß keine Substanzen mehr detektiert werden konnten. Dieses wurde sowohl für die Sephadex - als auch für die Kieselgelphasen festgestellt. Auf der anderen Seite wurde beim Einsatz geringer Mengen an stationärem Material keine Trennung des Stoffgemisches erzielt. Daher wurde auf die präparative Dünnschichtchromatographie zurückgegriffen. Auch hier konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Je stärker die Platte mit dem stationären Phasenmaterial beschichtet war, desto schwieriger wurde es, die getrennten Verbindungen wieder zu lösen. Es zeigte sich in der anschließenden Gaschromatographie, daß sich unter einem Spot in der Regel mehrere Substanzen verbargen.



**Abb. 32:** Chromatogramme der verschiedenen UV-Bestrahlungen

Daher wurde auf eine Kombination aus einfach aktiviertem und mit Silbernitrat imprägniertem Silikagelplatten mit möglichst dünner Beschichtung zurückgegriffen. Dieser Prozeß wurde mehrfach wiederholt, um eine für NMR-Messungen ausreichende Stoffmenge zu erhalten. Auf diese Weise konnten eine Substanz mit einem charakteristischen Fragmentation von  $m/z=137(100)$  amu erhalten werden ( $R_f=0,86$ ).

Bei der Fraktionierung über verschiedene Sephadex- und Kieselgelphasen ergab sich sowohl für die Säulen- wie auch für die Dünnschichtchromatographie folgendes Bild (Tabelle 9, Laufmittel ist Hexan/Diethylether 9/1):

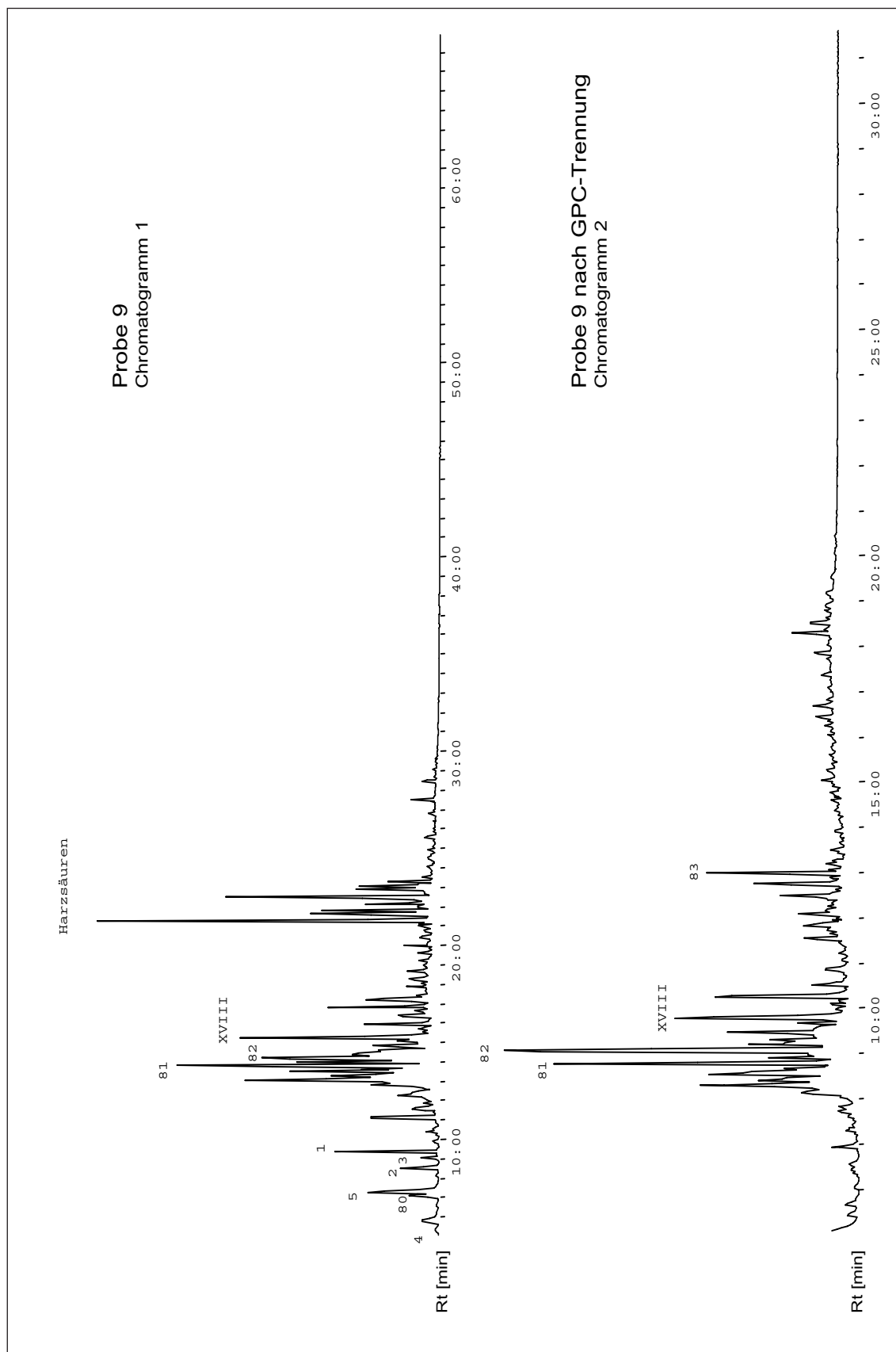
**Tab. 9:** Fraktionierung der Bernsteineextrakte

Rf-Wert	Identifikation	Fluoreszenz
0,013	Monoterpene	negativ
0,158	Gemisch	negativ
0,237	Gemisch	negativ
0,322	Gemisch	negativ
0,704	Gemisch	positiv
0,796	Gemisch	positiv
0,895	Gemisch	negativ

Es zeigte sich anhand von Referenzsubstanzen, daß die Monoterpene die kleinsten  $R_f$ -Werte (0,20), die Harzsäurenester die größten  $R_f$ -Werte besitzen (0,88).

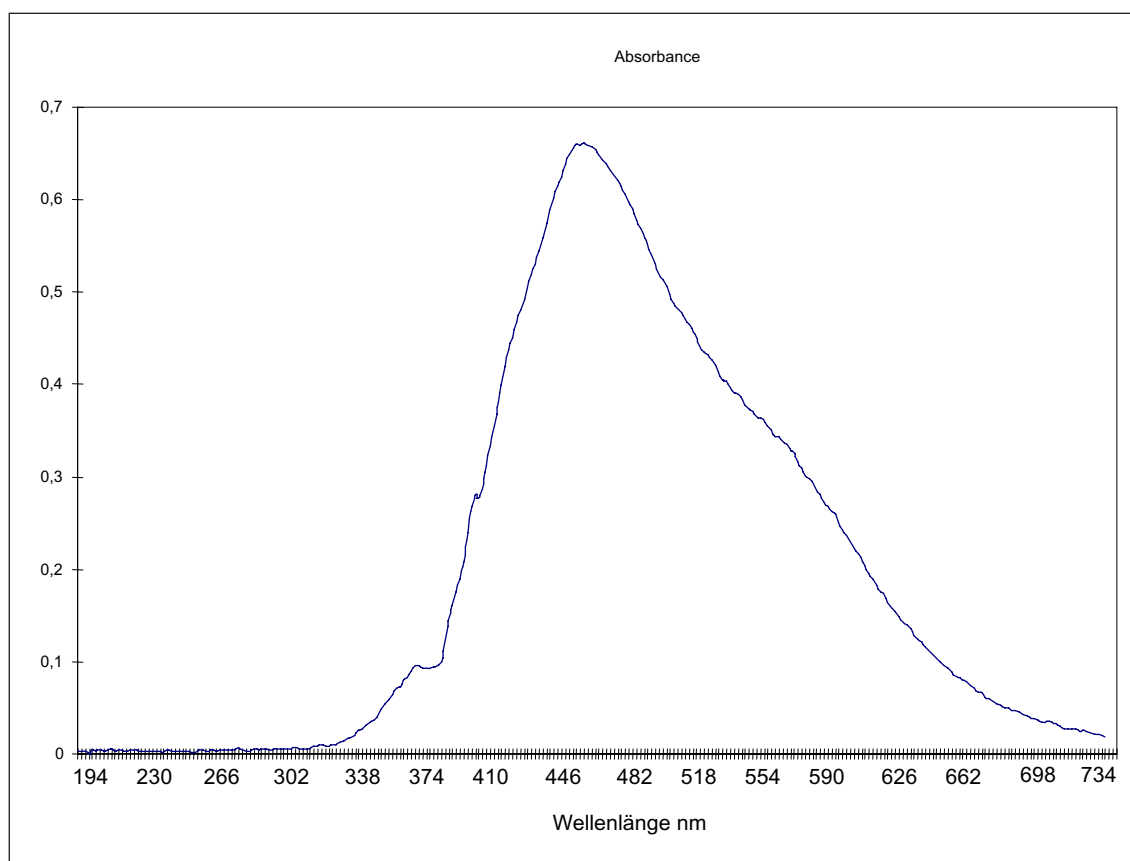
## 5.4 HPLC

Ein Vergleich von verschiedenen Chromatogrammen spiegelt am deutlichsten die Trennmöglichkeiten und ihre Grenzen verschiedener HPLC-Säulen wieder. Eingesetzt wurde die Bernsteinlösung P9 aus der Mikrowellenextraktion. Diese wurde zuvor unter Stickstoff eingeeengt. Zurück blieb ein gelbes, stark viskoses Öl, welches in Hexan aufgenommen wurde (Abbildung 33, Chromatogramm 1). Diese Lösung wurde über eine GPC-Säule mit Hexan als Laufmittel getrennt. Hierbei wurde versucht, einzelne Fraktionen nach Molekülgröße geordnet zu erhalten. Dabei wurde eine nur schwache UV-Aktivität detektiert. Diese reichte als Kriterium zur Fraktionsschneidung nicht aus, daher wurde stattdessen alle 30 Sekunden eine Probe über einen Zeitraum von 60 Minuten genommen. Es zeigte sich, daß die ersten 11 Proben identische Verbindungen aufwiesen. Der Vergleich mit der Ausgangslösung zeigt wenige Unterschiede (Abbildung 33, Chromatogramm 2).



**Abb. 33:** Vergleich der Probe P9 vor und nach der GPC-HPLC-Trennung

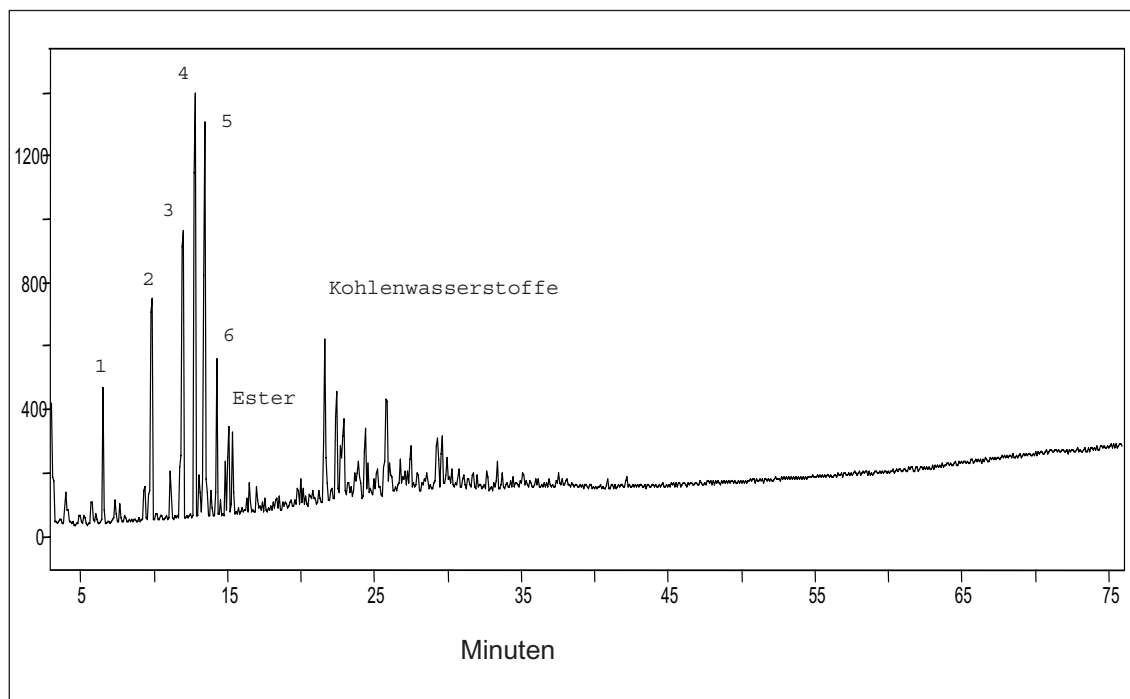
Es fällt auf, daß die Monoterpene und die Harzsäuren fehlen. Die Proben wurden vereinigt. Die so gewonnene Fraktion **H1** wurde im Gegensatz zu den übrigen als gelbe Lösung erhalten, die unter UV-Licht (350 nm) bläulich fluoreszierte. Unter Einwirkung von Luftsauerstoff ließ diese Fluoreszenz nach einiger Zeit nach, die Probe zersetzte sich. Die Fluoreszenzmessung ergab folgendes Emissionsspektrum (Abbildung 34):



**Abb. 34:** Fluoreszenzspektrum der Probe H1

Die zum gelben Öl eingeeengte Fraktion wurde dabei mit einem Laser der Wellenlänge 396 nm angeregt. Die Fluoreszenzaktivität reichte für die Ermittlung einer Quantenausbeute nicht aus.

Zusätzlich wurde dieses Öl (**H1**) mit dem GC-FTIR-System analysiert. Der Lauf ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 35):



**Abb. 35:** GC-FTIR-Chromatogramm der Fraktion H1

Folgende Verbindungen (**I1-6**) konnten identifiziert werden:

**I1** vermutlich 4-Hydroxybutansäurelacton

**I2** aromatischer Kohlenwasserstoff; vermutlich Isopropylbenzol

**I3** Isoborneol

**I4** Methylester

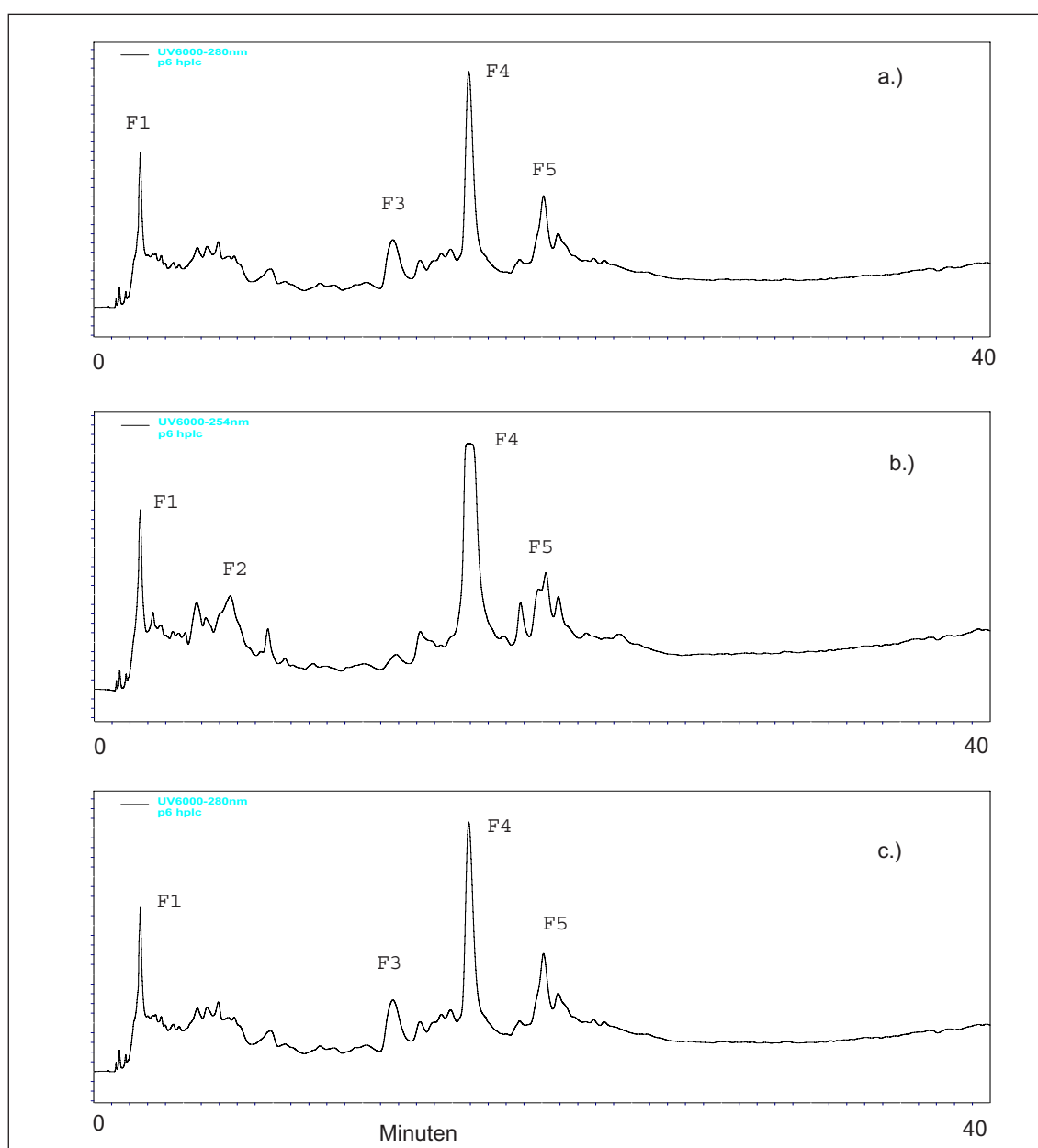
**I5** Borneol

**I6** verzweigtes Keton

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem GC-MSD-Chromatogramm, in dem Borneol nicht vorhanden ist. Auch der Anteil an aromatischen Verbindungen im GC-FTIR-Chromatogramm ist erstaunlich gering.

Bei der anschließenden Aufnahme des Öls in Methanol fiel ein weißlicher Niederschlag mit einem Schmelzpunkt von 169 °C aus. Der Versuch, diesen wieder in Lösung zu bringen, blieb ohne Erfolg.

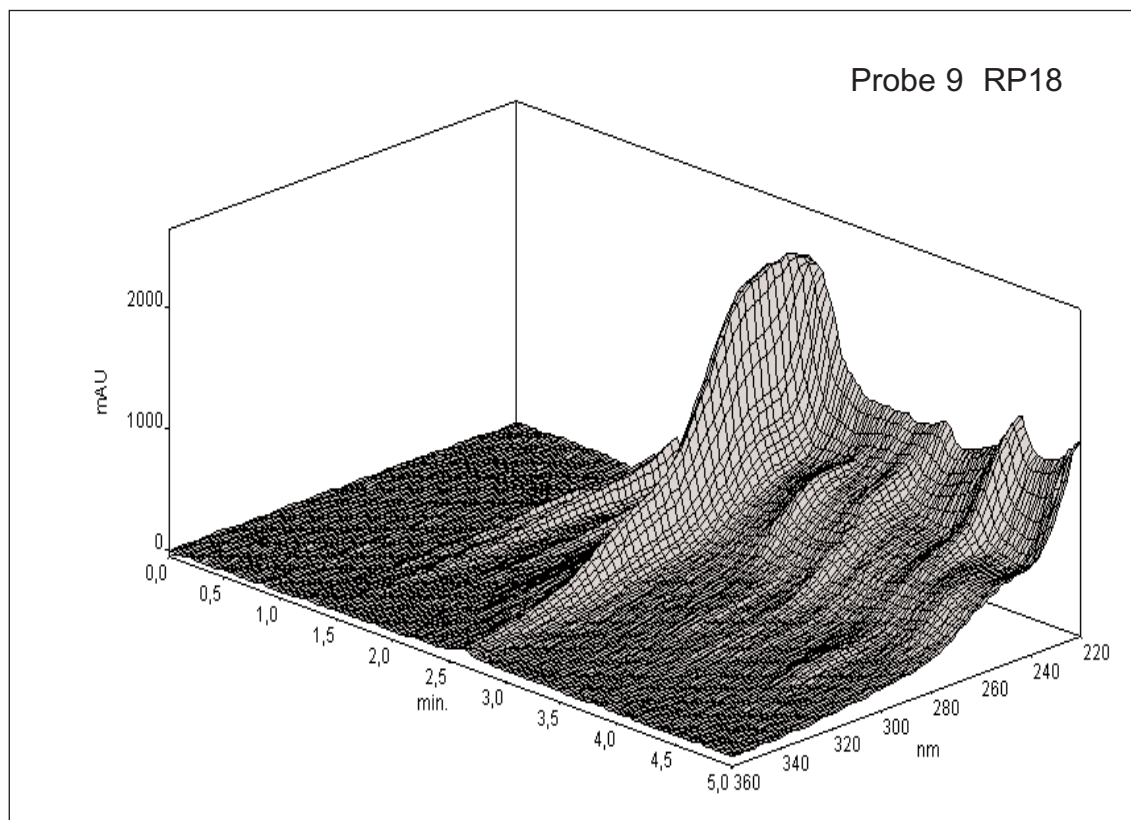
Die überstehende Lösung wurde über eine RP18-Säule weiter getrennt. Obwohl ca. 100 mg Rohsubstanz eingesetzt wurden, konnte über die präparative HPLC keine Trennung erreicht werden. Die UV-Aktivität ist bei dieser Substanzmenge schon zu schwach. Daher wurde auf die analytische HPLC unter mehrfacher Probenaufgabe zurückgegriffen. Hier konnte eine weitere Auftrennung auf 5 farblose Fraktionen (**F1-5**) erzielt werden (Abbildung 36, Chromatogramm 3a-c):



**Abb. 36:** Chromatogramm der Probe 9, Trennung über RP18

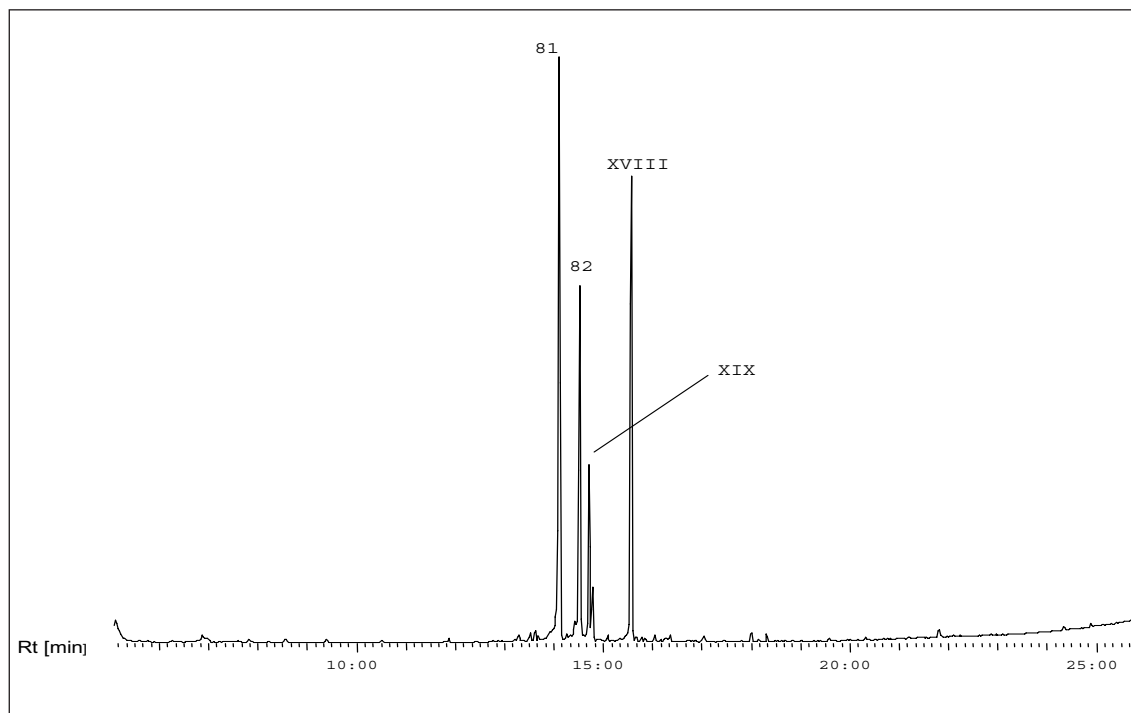
Nach dem Entfernen des Wasseranteils aus **F4** blieb ein weißer Niederschlag





**Abb. 37:** Dreidimensionale Darstellung der UV-Messung von Probe 9, RP18-Säule

Wie die anschließende gaschromatographische-massenspektrometrische Analyse der Hauptfraktion **F4** zeigte, besteht diese aus einem Gemisch von 4 aromatischen Verbindungen (Abbildung 38):



**Abb. 38:** GC-MS-Chromatogramm von F4

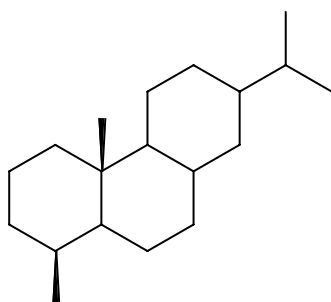
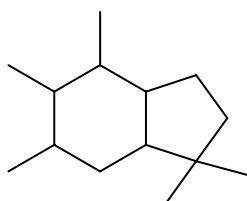
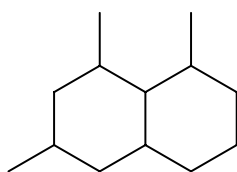
Folgende neue Verbindungen konnten in den bisher vorgestellten Chromatogrammen (Abbildung 33 und 38) identifiziert werden:

ortho- oder meta-Cumol (**80**)

1,2,3,4-Tetrahydro-1,6,8-trimethylnaphthalen (**81**)

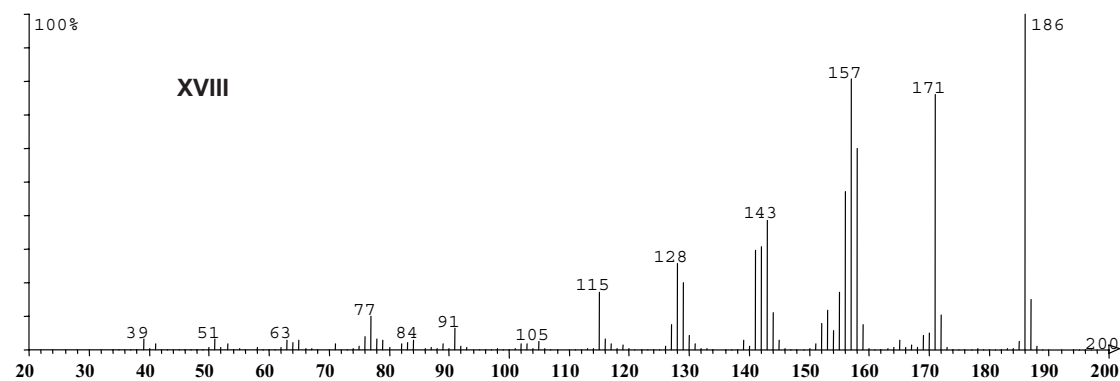
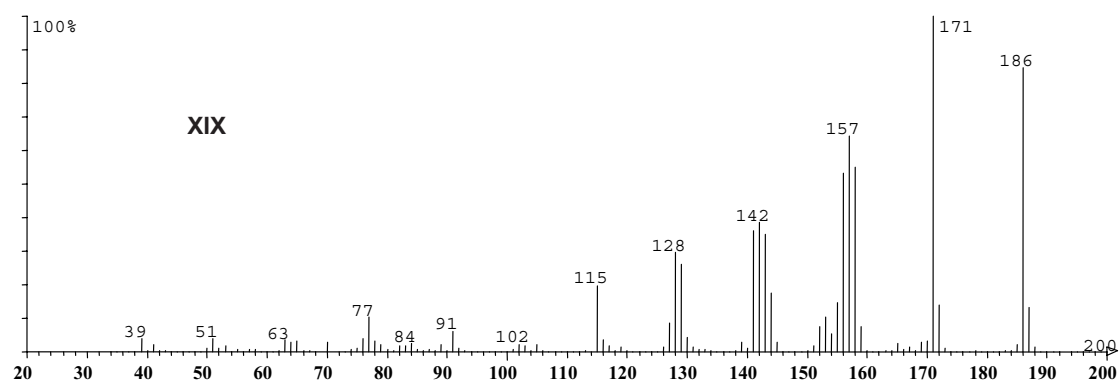
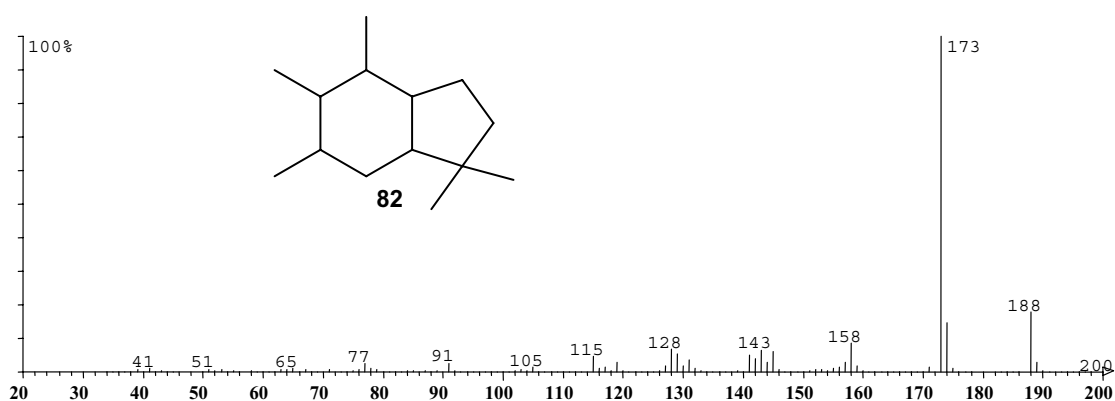
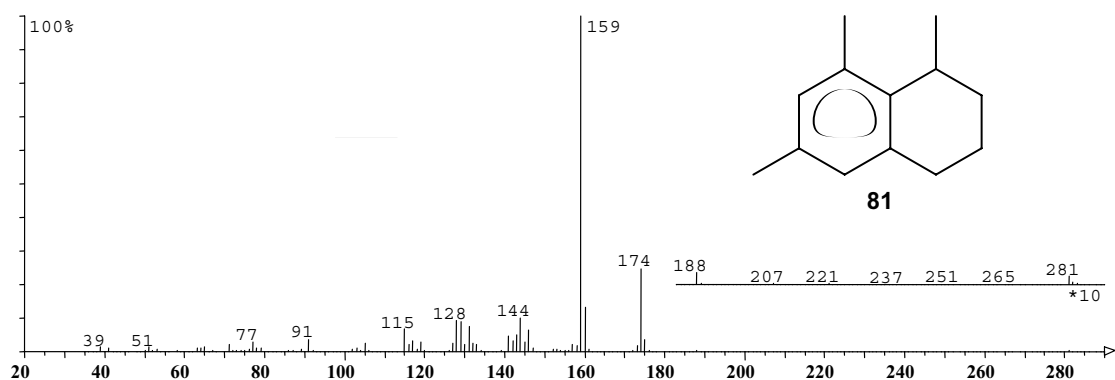
1,1,4,5,6-Pentamethyl-2,3-dihydroinden (**82**)

Abietatrien (**83**)

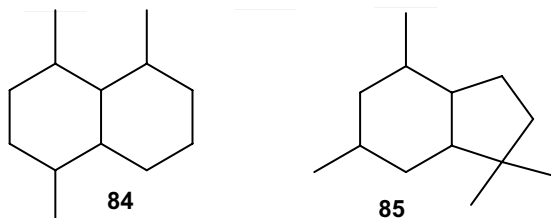


(**XVIII**)  $M^+$ : 186; B 186

Die entsprechenden Spektren der in der Fraktion **F4** identifizierten aromatischen Verbindungen (**81**, **82**, **XIX** und **XVIII**) sind nachfolgend dargestellt:

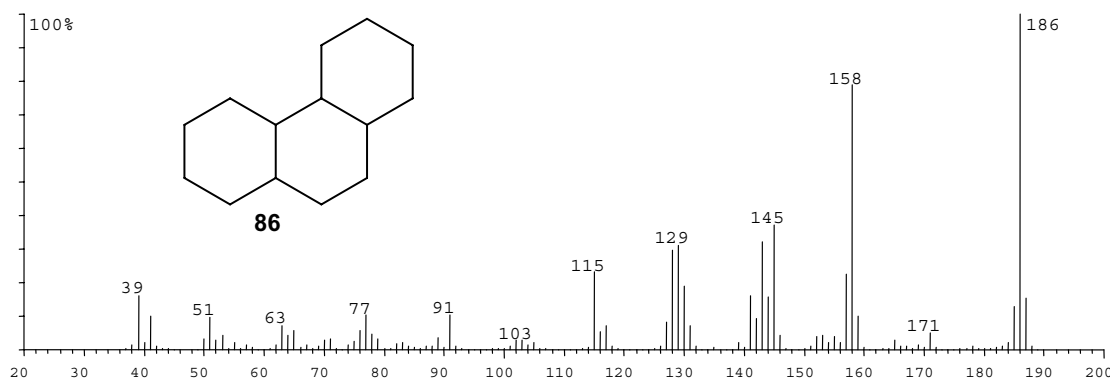


Die Substanzen 1,2,3,4-Tetrahydro-1,5,8-trimethylnaphthalin (**84**) und 1,1,4,6-Tetramethyl-2,3-dihydroinden (**85**) sowie die Verbindung **81** zeigen nahezu identisches Massenspektren.

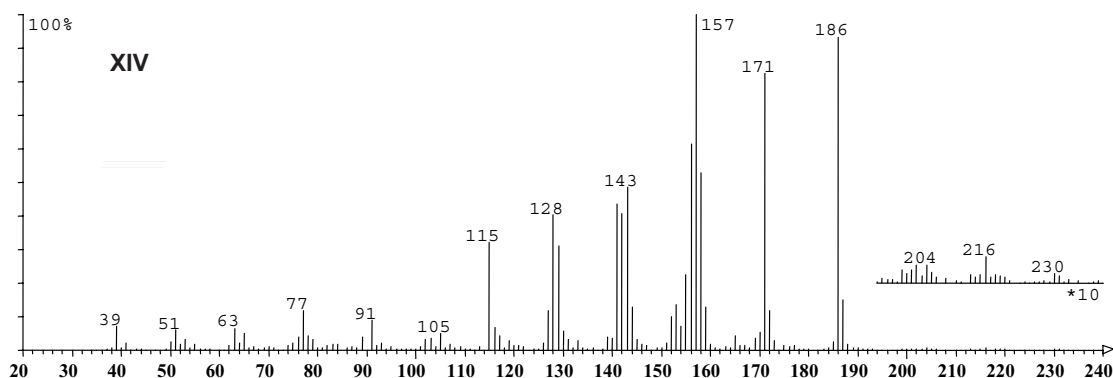


Die geringen Unterschiede liegen in dem Verhältnis der Fragmentionen  $m/z=131$  zu  $m/z=132$ . Bei **82** überwiegt die Intensität des Ions  $m/z=132$ , bei **81** ist das Ion  $m/z=131$  intensiver, und bei **85** fehlen beide Fragmentionen. Da bei dem gemessenen Spektrum der Fraktion 4 ebenfalls das Ion  $m/z=131$  überwiegt, wird diesem Spektrum die Substanz **81** zugeordnet.

Die Verbindungen **XVIII** und **XIX** konnten keiner eindeutigen Verbindungsklasse zugeordnet werden. Zwar entspricht das Spektrum von 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydrophenanthren (**86**) in seinen Fragmentionen den der unbekannten Substanz, das Intensitätsverhältnis der Fragmentionen zueinander ist allerdings nicht übereinstimmend.



Auffällig ist die Diskrepanz bei dem Fragmention  $m/z=171$ . Dieses  $[M-15]^+$ -Ion überwiegt bei den unbekannten Verbindungen deutlich und deutet auf eine Abspaltung von mehreren Methylgruppen hin. Die unterschiedlichen Intensitäten der Fragmentionen 157, 171 und 186 lassen auf das Vorliegen von Isomeren schließen. In diese Gruppe von Isomeren gehört auch die Substanz **XIV** aus der Pyrolyseanalytik:



In den übrigen Fraktionen aus der Trennung mit der RP18-Säule konnten folgende Verbindungen gefunden werden.

#### F1:

(XX):  $M^+$ : ?; 133(100), 151(72,7), 68(10,0), 77(8,2)

#### F2:

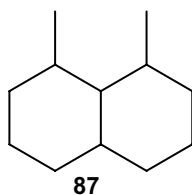
In diesem Lauf sind 3 Hauptsubstanzen enthalten, welche als XX, p-Cumol und XXI klassifiziert werden.

(XXI):  $M^+$ : 222; 191(100), 95(98,0), 109(61,6), 135(60,2), 121(54,7), 107(41,0)

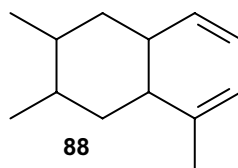
#### F3:

In dieser Fraktion sind neben der Verbindung XX noch zwei weitere Hauptsubstanzen zu finden:

1,2,3,4-Tetrahydro-1,8,dimethylnaphthalin (**87**)



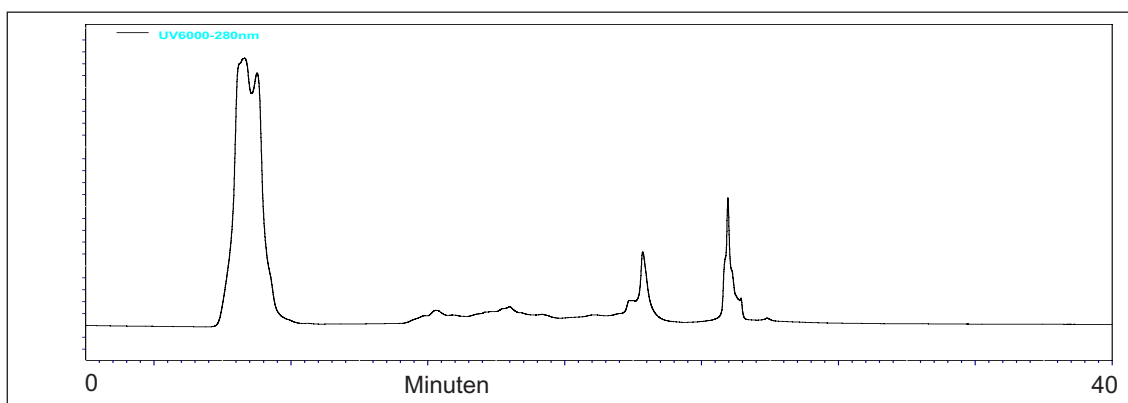
2,3,5-Trimethylnaphthalin (**88**)



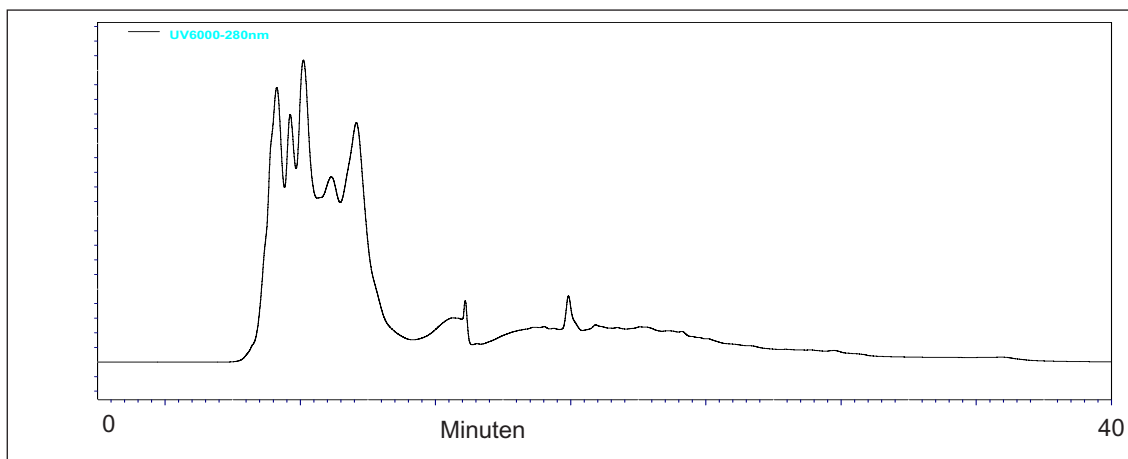
Nach dem Entfernen des Wasseranteils aus **F4** blieb ein weißer Niederschlag zurück, der sich kaum in Lösung bringen ließ. Da sich kein Schmelzpunkt unter 300°C feststellen ließ und eine DSC-Messung nur eine Zersetzung anzeigte, wird vermutet, daß hier möglicherweise Polymerisationsprozesse während des Entfernen des Lösungsmittels stattfanden. Für die Aufnahme eines NMR-Spektrums lag eine zu geringe Menge vor.

Es wurde versucht, diese Lösung über eine Kieselgelsäule weiter aufzutrennen. Dabei konnte nur eine einzelne Fraktion (**H2**) detektiert werden, die die obigen genannten aromatischen Verbindungen in Spuren enthielt.

Um das Problem der Wasserentfernung aus der Fraktionierung mit der RP18-Säule zu umgehen, wurde versucht, die aromatischen Verbindungen aus der gelben Lösung **H1** direkt mit der Kieselgelphase in einzelne Fraktionen aufzutrennen. Wie die Chromatogramme 3 und 4 (Abbildung 39) zeigen, verläuft die Trennung trotz gleichbleibender Bedingungen über die Si60-Säule nicht gleichmäßig. Ein gezieltes Auffangen von einzelnen Fraktionen war daher nicht möglich.



**Abb. 39a:** Chromatogramm 3 der Trennung H1, Si 60-Phase bei 280 nm



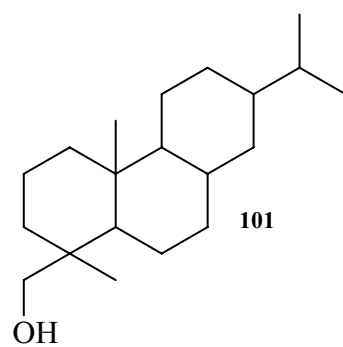
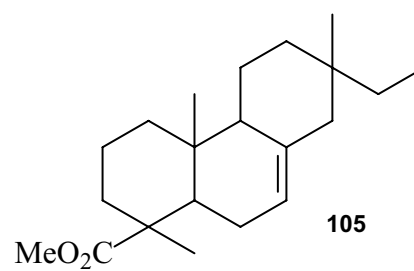
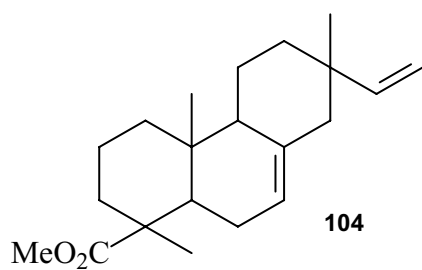
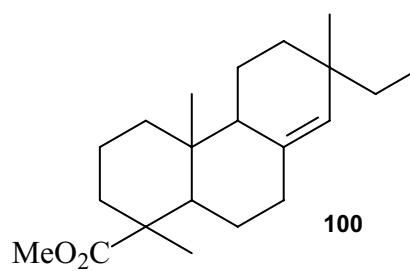
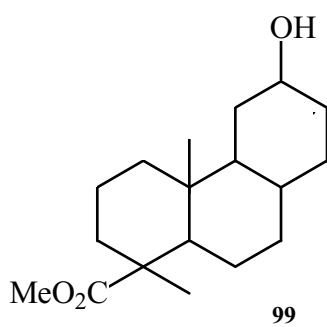
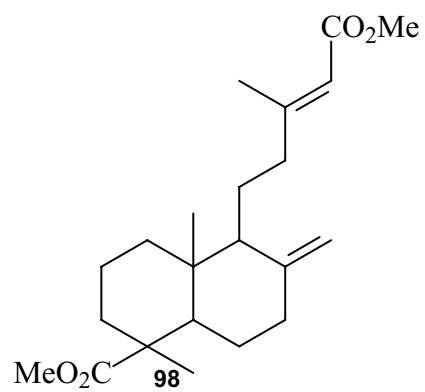
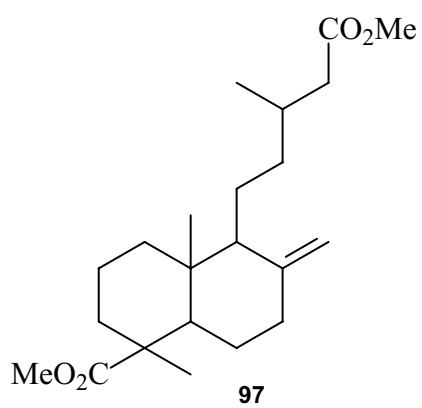
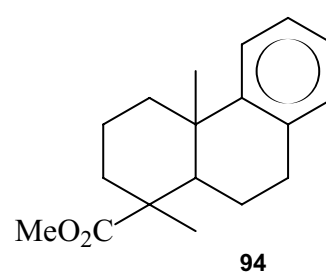
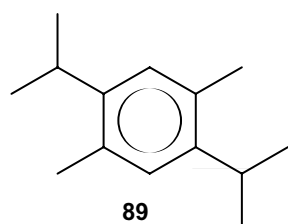
**Abb. 39b:** HPLC Si 60-Phase, Chromatogramm 4 der Trennung H1 bei 280 nm

## Ergebnisse aus der Massenspektrometrie

Da sich die Isolierung einzelner Verbindungen als äußerst schwierig erwies, erfolgte eine Identifizierung der löslichen Substanzen (methyliert) größtenteils über die Massenspektrometrie und den Vergleich mit bekannten Verbindungen aus Literatur [47] und Datenbank [95] (Tabelle 10):

**Tab. 10:** Identifizierte Verbindungen. Ordnung nach Retentionszeiten

Nr.	Verbindung
4	Camphen
80	m-Cumol
78	Bernsteinsäuredimethylester
5	p-Cumol
2	Fenchol
3	Campher
1	Borneol
6	Terpineol
7	Carvomenthon
89	1,4-Dimethyl-2,5-bis-1-isopropylbenzol
81	1,2,3,4-Tetrahydro-1,6,8-trimethylnaphthalin
82	1,1,4,5,6-Pentamethyl-2,3-dihydroinden
90	Calamen
91	Cadelen
93	1,4,6-Trimethylnaphthalin
94	Methyldeisopropyldehydroabietat
95	Fenchylmethylsuccinat
96	Bornylmethylsuccinat
97	Dimethylpinifolat
98	Dimethylagathat
26	Cembren
79	Dehydroabietan
99	Methylpodocarpat
100	Methylpimarat
45	Methylpallustrinat
101	Dehydroabienol
102	Methylsandaracopimarat
103	Methyldehydropimarat
104	Methylisopimarat
105	Methyldehydroisopimarat
106	Methyl-8(14)-pimaren-18-oat
107	4-Epidehydroisopimarat
44	Methyldehydroabietat
43	Methylabietat





Zur besseren Chromatographierbarkeit wurden die Verbindungen zuvor mit Diazomethan methyliert. Die in Tabelle 10 aufgeführten Methylester zeigen daher die Anwesenheit der entsprechenden Harzsäuren in den Bernsteinproben. Methylester wurden in den unmethylierten Vergleichsproben nur in untergeordneter Menge gefunden.

Die Hauptkomponenten sind neben den Harzsäuremethylestern des Pimaran- und Abietantyps, insbesondere Dehydroabietinsäuremethylester, die Verbindungen **81**, **82** und **XVIII**.

Übrig bleiben eine Reihe unbekannter Verbindungen, deren Spektren in den Datenbanken bislang nicht vorhanden sind. Der Spektrenstruktur nach scheint es sich um aromatische, teilhydrierte Polycyclen und terpenoide Verbindungen zu handeln. Auffällig sind einige homologe Reihen, die im nachfolgenden tabellarisch aufgelistet sind (Siehe Tabelle 11 bis 19, exemplarische Spektren siehe Anhang).

**Tab. 11:** Homologe zur Verbindung **XVIII**

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
187	202	173, 159, 147
187	250	173, 159, 147
187	415	173, 159, 147
187	204	171, 159, 147
187	204	171, 159, 145

**Tab. 12:** Aromatische Verbindungen mit charakteristischem Fragmention  $m/z=175$

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
175	202	119, 105, 91, 77
175	250	119, 105, 91, 77
175	450	119, 105, 91, 77

**Tab. 13:** Aromatische Verbindungen mit charakteristischem Fragmention  $m/z=119$

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
119	190	133, 175, 105, 91, 77
119	202	133, 173, 105, 91, 77
119	202	133, 175, 105, 91, 77
119	204	133, 173, 105, 91, 77
119	204	133, 175, 105, 91, 77

Die Spektren der Verbindungen in Tabelle 13 zeigen eine große Ähnlichkeit mit

dem Spektrum von p-Cumol (M 134, B 119).

Es wurde anhand der charakteristischen, aromatischen Fragmentationen  $m/z=77$ , 91 und 105 bei den Tabellen 11 bis 14 auf das Vorliegen von unbekannten, aromatischen Substanzen geschlossen.

Bei den nachfolgenden Tabellen fehlen diese typischen aromatischen Fragmentationen. Daher wird vermutet, daß es sich bei diesen Verbindungen um terpenoide Substanzen handelt.

**Tab. 14:** Aromatische Verbindungen mit charakteristischem Fragmention  $m/z=131$

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
131	258	157, 105, 91, 81, 187
131	272	157, 105, 91, 81

**Tab. 15:** Verbindungen mit charakteristischen Fragmenten  $m/z=95$  und 105

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
133	392	95, 105, 377
133	450	95, 105, 257, 375
133	450	95, 105, 229, 289

**Tabellen 16/17:** Terpenoide Verbindungen mit charakteristischen Fragmenten  $m/z=95$  und 121

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
95	192	121, 136, 177
95	206	121, 136, 107
95	220	121, 136

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
191	206	121, 95, 135, 109
191	206	121, 95, 135, 109 Isomer
191	222	121, 95, 135, 109

Typisch für Borneol ist im Gegensatz zu anderen Terpenen ein Ion der Masse  $m/z=95$ . Zusammen mit dem charakteristischen Fragment  $m/z=121$  liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um Borneolderivate handelt. Da die Abietinsäure und die Pimaransäuren andererseits ebenfalls diese Fragmentationen aufweisen, können hier auch Abbauprodukte der Harzsäuren vorliegen. Diese Fragmentationen treten in geringer Intensität auch bei den höhermolekularen Verbindungen auf (Spektren siehe Anhang):

(XXII)  $M^+$  355, B306

(XXIII)  $M^+$  430, B289

(XXIV)  $M^+$  452, B289

(XXV)  $M^+$  480, B289

(XXVI)  $M^+$  542, B257

**Tab. 18** Homologe Reihe mit charakteristischem Fragmention  $m/z = 115$

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
115	240	81, 236, 153
115	240	81, 189, 207
115	240	95, 136, 154, 173
115	268	95, 136 Methylbornylsuccinat
115	?	95, 136, 153, 207
115	?	95, 136, 173, 204

Desweiteren konnte eine Verbindung mit einem Massenpeak von 400 und einem Basepeak von 253 detektiert werden, die ebenfalls das charakteristische Fragmention  $m/z=115$  enthält. In der Literatur [47] ist diese Verbindung als Methyldehydroabietylsuccinat (**108**) angegeben.

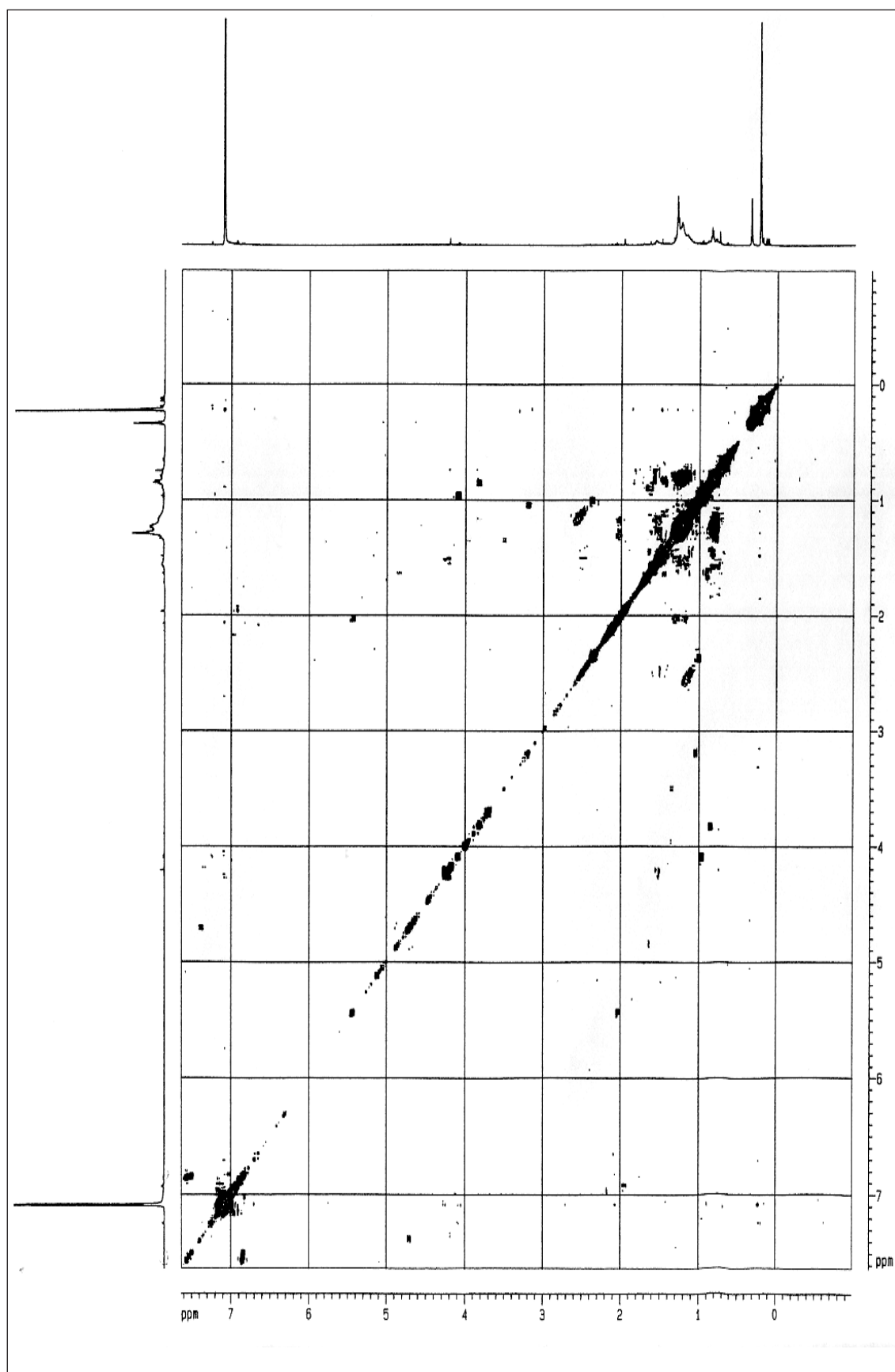
Weiterhin konnten Ester mit einem charakteristischen Basepeak von  $m/z=137$  detektiert werden (Spektren siehe Anhang) :

**Tab. 19** Ester mit einem charakteristischen Fragmention  $m/z=137$

Basepeak	Massenpeak	charakteristische Ionen
137	438	81, 287, 257, 302, 396
137	438	81, 301
137	438	81, 287, 301, 257, 396
137	438	81, 287, 257, 175, 331, 396 mehrerer Isomere
137	436	81, 285, 239
137	390	81, 239, 285
137	390	81, 239, 285 Isomer
137	390	81, 153, 287, 241
137	390	81, 254, 287, 302
137	390	81, 153, 237, 287
137	348	81, 167, 227, 287
137	348	81, 254, 257, 289, 332
137	346	81, 241, 316, 223, 289
137	260?	81, 152, 203, 245

Es handelt sich hier um Bornyl- bzw. Fenchylester mit verschiedenen Harzsäuren. Der Basepeak stammt aus dem Camphyl- (**109**), bzw. Fenchylion (**110**). Eine eindeutige Unterscheidung beider Reste ist nur mittels NMR-Spektren möglich. Es konnte ein Ester mit der Masse  $m/z=438$  isoliert und mit

Hilfe der Kernresonanzspektrometrie untersucht werden. Die Mengen waren jedoch zu gering, um interpretierbare  $^{13}\text{C}$ -Spektren zu erhalten. In der nachfolgenden Abbildung 40 ist das dazugehörige  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum dargestellt. Es kann lediglich ein einzelnes Proton bei 4,1 ppm als das singuläre C2-Proton des Camphyls interpretiert werden. Danach liegt ein Bornyl- und kein Fenchylester vor. Um weitere Ester zuzuordnen, wurden Vergleichssubstanzen synthetisiert. Dabei konnten die Verbindungen mit der Masse  $m/z=436$  eindeutig als Dehydroabietinsäureester von Borneol (**111**) und Fenchol (**112**) identifiziert werden. Die Verbindungen der Massen  $m/z=438$  sind Ester der Abietansäure und Pimaransäure. Da diese sich in ihrer Fragmentierung im wesentlichen nur durch die Abspaltung des Isopropylrestes ( $\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7$ ) bzw. Allylrestes ( $\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5$ ) unterscheiden, erfolgte die Zuordnung weiterer Ester über den Vergleich der Retentionszeiten. Es konnten somit noch die Ester der Abietinsäure und Isopimarsäure zugeordnet werden. Einige der Verbindungen mit der Masse  $m/z=390$  stellten sich als Dibornyl- (**113**) und Difenchylsuccinat (**114**) <sup>[47]</sup> heraus. Möglicherweise handelt es sich bei den übrigen Isomeren um Stereoisomere des Borneols oder Fenchols.



**Abb. 40:**  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY des Bornylesters mit der Masse  $m/z=438$

## 5.6 Polymerisationsversuche mit Kiefernharz

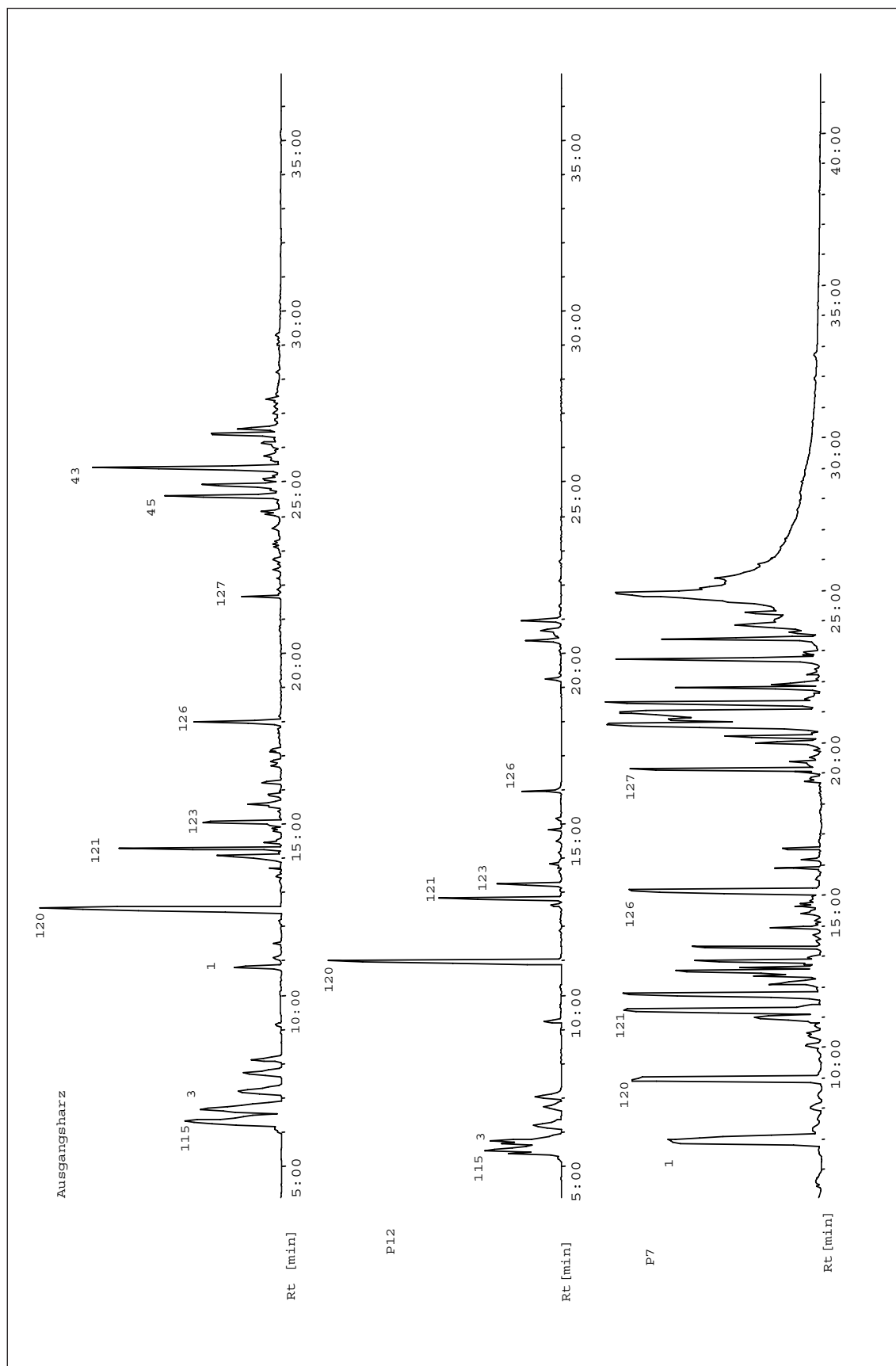
Um einen Einblick in mögliche Reaktionen von Terpenen im Kiefernharz zu erhalten, wurden einige Vergleichsexperimente mit einem unbehandelten, reinem Kiefernharz der Firma Kaderer durchgeführt. Eine Analyse des zuvor methylierten Harzes zeigt folgende Inhaltsstoffe (Tabelle 20):

Dieses Harz wurde unter verschiedenen Bedingungen (Kapitel 4, Seite 48) unter

**Tab. 20:** Inhaltsstoffe des Kiefernharzes der Fa. Kaderer

Nummer	Name
115	$\alpha$ -Pinen
3	Camphen
116	$\beta$ -Pinen
117	3-Caren
6	Terpinol
1	Borneol
118	Crypton
119	Tymylmethylether
120	Bornylacetat
121	Isocaryophyllen
122	Isolongifolen
123	$\alpha$ -Humulen
124	$\beta$ -Bisabolen
125	Nerolidol
126	$\alpha$ -Bisabolol
127	Epimanoxyloxid
96	Methylpimaral
97	Methylsandaracopimaral
98	Methylisopimaral
44	Methyldehydroabietal
43	Methylabietal
128	Methyl-7,13,15-abietatrienoat

Stickstoff mehrere Wochen autoklaviert. Weiterhin wurden Teile des Harzes mit den UV-Lampen von 450 W und 700 W je 19 Stunden bestrahlt. Um zu untersuchen, ob die Extraktion von Bernstein mit der Mikrowelle zu Artefakten führt, wurden Proben der bestrahlten Harze und des Ausgangsharzes unter gleichen Bedingungen wie die Bernsteinproben in der Mikrowelle extrahiert. Die Ergebnisse aller Versuche (Abbildung 41) sind in der nachfolgenden Tabelle 21 dargestellt:

**Abb. 41:** Chromatogramme der Vergleichsexperimente

**Tab. 21:** Ergebnisvergleich der einzelnen Kiefernharzexperimente mit dem Ausgangsharz

Nummer	Probe 7 70°C, 100bar	Probe 8 70°C, 50 bar	Probe 10 bestrahlt,70°C, 100 bar	Probe 12 450 W	Probe 13 50 °C 300 bar
115	neg	pos	neg	pos	pos
3	neg	pos	pos	pos	pos
116	neg	pos	neg	pos	pos
117	neg	neg	neg	pos	pos
6	pos	neg	neg	neg	neg
1	pos	pos	pos	pos	neg
118	neg	neg	neg	neg	neg
119	pos	pos	pos	neg	pos
120	pos	pos	neg	pos	pos
121	pos	pos	neg	pos	pos
122	neg	pos	neg	neg	pos
123	pos	pos	neg	pos	pos
124	pos	pos	neg	pos	pos
125	pos	pos	neg	pos	pos
126	pos	pos	neg	pos	pos
127	neg	pos	neg	pos	pos

Aufgrund schlechter Chromatographierbarkeit konnten bei den Proben 7 und 13 die Harzsäuren nicht eindeutig zugeordnet werden. In den übrigen Proben wurden die Säuren nicht detektiert.

Ein Vergleich zwischen der in der Mikrowelle extrahierten Harzprobe und dem Ausgangsharz weist ebenso keine Unterschiede auf, wie der Vergleich der bestrahlten Proben mit und ohne Mikrowellenextraktion zeigt. Es treten auch keine weiteren Verbindungen auf. Die im Bernstein identifizierten aromatischen Substanzen stammen demnach eindeutig aus dem Bernstein und sind keine Artefakte der Extraktion. Nebenreaktionen oder Degradationsprozesse unter dem Einfluß von Mikrowellenstrahlung können daher definitiv ausgeschlossen werden.

Dagegen treten bei der UV-Bestrahlung und beim Autoklavieren neue Verbindungen auf (Tabelle 22). Bei der UV-Bestrahlung finden sich anstelle der Harzsäuren die entsprechenden Alkohole vom Abietan- und Labantyp. Unterschiede zwischen den verschiedenen Intensitäten der UV-Bestrahlung konnten nicht festgestellt werden. Auffällig ist, daß die Sesquiterpene wie auch die Monoterpene im Gegensatz zu den Harzsäuren unter UV-Einfluß nicht



abnehmen oder verschwinden. Entweder sind diese leichtflüchtigen Terpene widerstandsfähiger als vermutet oder die Dauer der Bestahlung reichte trotz der deutlich erhöhten Intensität verglichen mit der atmosphärischen UV-Stahlung nicht aus, um eine Abnahme zu bewirken.

Bei den Autoklavenversuchen zeigte sich, daß die Sesquiterpene nicht reagieren. Eine Abnahme ihrer Konzentration wurde ebenfalls nicht beobachtet. Stattdessen traten in geringerer Konzentration neue Sesquiterpene auf. Dagegen war ein deutlicher Rückgang der Monoterpene Pinen und Camphen unter gleichzeitiger quantitativer Zunahme von Borneol zu verzeichnen. Oxidationsprozesse der Doppelbindungen in Pinen und Camphen zur Hydroxy- oder Carbonylgruppe sind nicht auszuschließen. Allerdings sind auch Polymerisationsreaktionen von Pinen unter Stickstoff bei Raumbedingungen bekannt [97].

**Tab. 22:** Weitere Verbindungen aus den Experimenten

Nr.	Verbindung
<b>129</b>	Caryophyllenoxid
<b>130</b>	11,13-Labdadien-18-ol
<b>131</b>	Abienol
<b>132</b>	Longipinen
<b>133</b>	Ylangen
<b>134</b>	1,4-Methanoazulen
<b>135</b>	Geranylacetat
<b>136</b>	Himachalen
<b>137</b>	1,5,5,9-Tetramethylspiro[5.5]undeca-1,8-dien
<b>138</b>	Longiborneol
<b>139</b>	1-Naphthalenol
<b>140</b>	Trachyloban
<b>141</b>	11,13-Labdadien-18-ol
<b>142</b>	13-Methyl-13-vinylpodocarp-7-en-3-on

Es konnte gezeigt werden, daß unter Druck chemische Reaktionen in den Modellharzen stattfanden und neue Substanzen gebildet wurden. Die Proben lagen nach dem Öffnen der Autoklavenbehälter als feste, orangefarbende Materialien vor, die sich wegen einer großen Menge an eingeschlossener Gasblasen spröde verhalten. Die Löslichkeit in Dichlormethan ist wie die des Ausgangsharzes im Gegensatz zum Bernstein gut. Die einzige Ausnahme bildet die Probe 8, die unter den mildesten Bedingungen erzeugt wurde. Die Probe ließ

sich nur schwer lösen; zurück blieb eine milchigtrübe Lösung. Die Harzsäuren oder ihre Alkohole konnten nicht detektiert werden. Dafür sind noch Pinen und Camphen in geringen Mengen vorhanden.

Erstaunlich ist die Zunahme der sauerstoffhaltigen Verbindungen, da die Bedingungen im Autoklaven anaerob gehalten wurden. So konnten mehrere Terpene mit Hydroxy- oder Carbonylgruppen identifiziert werden.

Möglicherweise stammt der Sauerstoff aus dem im Harz vorliegenden Wasser oder ist gasförmig im Harz eingeschlossen.

## 6 Zusammenfassung

Die genaue chemische Struktur des Bernsteins ist bisher unbekannt. Eine Analyse zur Bestimmung der monomeren Bausteine im Polymer Bernstein ist kompliziert. Erschwert wird sie durch die geringe Löslichkeit des Bernsteins in organischen Lösungsmitteln. Klassische naßchemische Analysenverfahren, wie z.B. Säulenchromatographie, erfordern weiterhin die Kombination von verschiedenen Geräten und Trennverfahren. Neben diesen klassischen Isolationsmethoden wurde daher zur Identifikation zusätzlich die analytische Pyrolyse angewandt. Die Trennung und Isolierung einzelner Bausteine aus der Matrix Bernstein ist bislang kaum untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher in der Fragestellung, welche Analysenmethode am geeignetsten ist, um einen möglichst umfangreichen Einblick in die Struktur des Polymers zu erhalten. Natürlich sollen dabei die einzelnen Bausteine möglichst vollständig identifiziert werden.

Die Ergebnisse der gängigen analytischen Trennmethoden haben folgendes gezeigt:

1. Für die Bestimmung der löslichen Verbindungen über analytische Methoden ist der Einsatz von größeren Mengen Bernstein nötig. In dieser Arbeit wurden Bernsteine in der Größe von 4 bis 42 g eingesetzt. Die besten Ergebnisse konnten dabei mit dem Extrakt des größten Bernsteins erzielt werden. Für weitere naßchemische Untersuchungen sollten wegen der schlechten Löslichkeit und dem Substanzverlust durch die Kombination der Analysenmethoden Bernsteine von mindestens dieser Größenordnung verwendet werden.

2. Die Isolierung von einzelnen Verbindungen über das klassische Trennverfahren der Säulen- bzw. Dünnschichtchromatographie ist, wie diese Arbeit gezeigt hat, in der Kombination mehrerer stationärer Phasen durchaus möglich. Die Komplexität der Matrix und ihre hohe chemische Affinität zur stationären Phase lassen eine Isolierung nur unter großem Materialverbrauch und Zeitaufwand zu. Die präparative Dünnschichtchromatographie mit einer möglichst dünnen Beschichtung erwies sich als besonders günstig. Als erste Vortrennung ist Sephadex gegenüber Kieselgel vorzuziehen, da Polaritätsunterschiede bei der Trennung der Substanzen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Wegen des wiederholten Trennmodus und der hohen chemischen Affinität der Verbindungen zur stationären Phase ist bei der präparati-

ven Dünnschichtchromatographie der Substanzverlust besonders hoch. So konnten bei einem Ausgangsvolumen von insgesamt 3 g nur sehr geringe Mengen eines Bornylesters isoliert werden, die für die Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums nicht ausreichend waren.

Zusammenfassend können diese chromatographische Verfahren zwar angewendet werden, es ist allerdings zu überlegen, ob sie nicht wegen des hohen apparativen und zeitlichen Aufwands zugunsten anderer Methoden zurückgestellt werden sollten.

3. Die Trennung über einen präparativen Gaschromatographen konnte wegen der oben schon erwähnten hohen chemischen Affinität bei zunehmender Belegung mit stationärem Phasenmaterial nicht erfolgreich durchgeführt werden. Für diese Arbeit standen nur präparative Gaschromatographen für Metallsäulen von mindestens 1cm Durchmesser zur Verfügung. Diese SE-30-Säulen wiesen eine zu große Schichtdicke auf, um erfolgreich Substanzen detektieren zu können. Eine Möglichkeit, mit Hilfe der präparativen Gaschromatographie erfolgreich Substanzen zu trennen und zu isolieren, wäre die Verwendung von dünnen und sehr langen Kapillarsäulen, die mittlerweile für diese Methode entwickelt worden sind.

Für weitere Arbeiten am Bernstein ist dieses sicherlich ein gutes Trennverfahren, da der Substanzverlust minimal gehalten und mit der Wahl einer entsprechend langen Säule und eines langsamen Temperaturprogramms auch eine gute Trennung erzielt werden kann.

4. Die Trennung über die HPLC ist, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, von der Wahl der Säulen abhängig:

Die Kieselgelsäulen erwiesen sich dabei als die eindeutig schlechteste Wahl. Die Schwankungen innerhalb der einzelnen Messungen trotz stets gleichbleibender Trennparameter und der Injektion über einen Autosampler waren zu groß, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen.

Die Gel-Permeations-Säule in der präparativen HPLC zur ersten Vortrennung der polymeren Matrix nach Molekülgröße hat sich dagegen bewährt. Größere Mengen konnten erfolgreich aufgetrennt werden. Für die vorliegende Arbeit stand nur eine GPC-Säule mit einer Porengröße von 100 Å zur Verfügung. Da beim intensiven Reinigen der Säule nach der eigentlichen Trennung noch größere Mengen von Polymerbruchstücken mit Massen über  $m/z=500$  von der stationären Phase gelöst werden konnten, ist diese Porengröße für den ersten

Trennschritt zu klein. Es bietet sich eine Kombination verschiedener GPC-Säulen, beginnend mit einem größeren Porendurchmesser an. Als letzter Schritt kann für eine optimale Trennung dann eine Säule mit einer Porengröße von 50 Å verwendet werden.

Dieses Trennverfahren zeichnete sich durch geringe Substanzverluste aus. Weiterhin wird als mobile Phase Hexan verwendet, welches ohne Schwierigkeiten oder Verluste innerhalb der einzelnen Fraktionen wieder entfernt werden kann.

Letzteres erwies sich als Problem bei der Fraktionierung mittels einer Reversed-Phase-18-Säule. Eine weitere Auftrennung der aus der GPC-Trennung erhaltenen Fraktionen verlief positiv, so daß die RP18-Säule für die Fraktionierung der löslichen Bernsteinmonomere eingesetzt werden kann. Wie die anschließende Analyse mittels der gaschromatographischen Massenspektrometrie allerdings zeigte, liegen in den über die RP18-Säule gewonnenen Phasen keine Reinsubstanzen, sondern Gemische von bis zu vier Substanzen vor. Ein weiterer Trennschritt ist also notwendig. Hierfür würde sich die präparative Gaschromatographie als letzter Trennschritt gut eignen.

Das Problem bei dem RP18-HPLC-Verfahren liegt im Wasser-Methanol-Gradienten, der für eine optimale Trennung nötig ist. Für eine weitere Analyse oder Fraktionierung muß das Wasser entfernt werden. Da es sich bei den Substanzgemischen um aromatische Verbindungen handelt, kann das Methanol nicht im Hochvakuum entfernt werden. Dabei würden neben dem Wasser auch die aromatischen Verbindungen mitgerissen werden. Das klassische Verfahren des Ausschüttelns mit einem hydrophoben Lösungsmittel wie Pentan oder Dichlormethan brachte keine Erfolge. Das schonendere Vakuumverfahren des Gefriertrocknens verhinderte zwar ein Mitschleppen der aromatischen Substanzen beim Entfernen des Lösungsmittels, begünstigte allerdings das Ausfallen eines Niederschlages, der sich anschließend nur schwer wieder in Lösung bringen ließ.

Zusammenfassend kann mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß der Einsatz der HPLC für eine umfangreiche Trennung sehr sinnvoll ist, die Isolierung einzelner Verbindungen damit allerdings nicht erreicht werden kann. Es bietet sich hierbei besonders die Gel-Permeationschromatographie als analytisches Verfahren an. Für die Isolierung wäre eine Kombination aus präparativer GPC-HPLC und präparativer Gaschromatographie am besten geeignet.

Eine Identifizierung einzelner Verbindungen über die UV-Spektroskopie ist kaum möglich, da, wie gezeigt wurde, in den Fraktionen keine Reinsubstanzen vorlie-

gen und die UV-Spektren bei isomeren Verbindungen nicht sehr aussagekräftig sind.

4. Die analytische Pyrolyse mit anschließender gaschromatographischer Trennung und kombinierter Massenspektrometrie hat sich als Instrument zur Identifizierung von komplexen, schwer- oder unlöslichen organischen Polymeren bewährt. Daher ist der Einsatz der Pyrolyse für die Strukturidentifizierung von Bernstein sinnvoll. Die Verwendung einer Kopplung der Pyrolyseeinheit mit einem präparativen Gaschromatographen als eine Methode zur Fraktionierung und Isolierung von einzelnen Pyrolyseprodukten ist denkbar.

Mit dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, daß die klassischen naßchemischen Methoden der Säulen- und Dünnschichtchromatographie für Isolierungen von Verbindungen aus dem löslichen Anteil des Bernsteins einen zu hohen Substanzverlust mit sich bringen, um in Anbetracht der großen Anzahl unbekannter Substanzen, die es strukturell aufzuklären gilt, als akzeptable Methode in Frage zu kommen.

Dagegen ist die Anwendung der HPLC besonders in Kombination mit der präparativen Gaschromatographie als geeignete Methode vorzuziehen und in zukünftigen Arbeiten zu optimieren.

Die Isolierung von Verbindungen ist deswegen so wichtig, da die Massenspektrometrie allein zur Identifizierung nicht ausreicht. Wie diese Arbeit zeigt, kann nur eine geringe Anzahl an Verbindungen über ihre Massenspektren bekannten Verbindungen zugeordnet werden. Die Anzahl der bislang publizierten Verbindungen aus dem Bereich der Diterpene und ihrer möglichen Abbauprodukte ist hierfür zu gering. Die Fragmentierungen der einzelnen Substanzen zeigen dagegen oft ein sehr komplexes Muster, so daß nur sehr schwer auf eine mögliche Struktur geschlossen werden kann.

Erschwerend kommt hinzu, daß bei den terpenoiden Verbindungen mindestens ein Stereozentrum, in der Regel eher mehrere vorliegen, die wiederum deutlich unterschiedliche Fragmentierungsmuster hervorrufen können und zu komplexen Isomerenmischungen führen. Die Strukturaufklärung kann daher nur über die Kernresonanzspektroskopie erfolgen, wofür Reinsubstanzen in einer genügend hohen Konzentration von mindestens 1 mg vorliegen müssen. Dieses kann wahrscheinlich mit der oben erwähnten Kombination aus HPLC und GC erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit, auf die an dieser Stelle hingewiesen werden

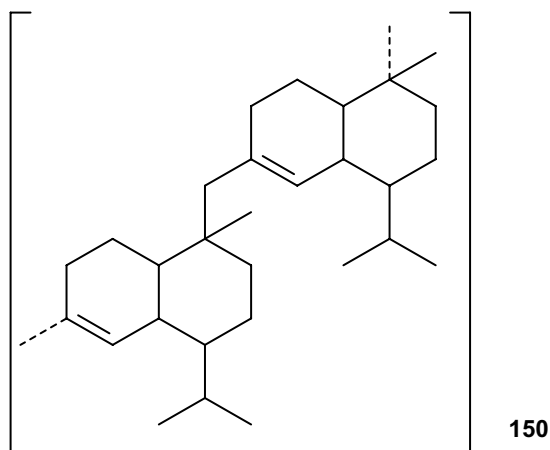
soll, ist die Kombination von HPLC mit einem direkten Einlass in ein Kernresonanzspektrometer. Hierbei sollen in der Zukunft für die Strukturaufklärung von Naturstoffproben Mengen von weniger als 1mg ausreichen [98,99].

Ein anderer Schwerpunkt der Arbeit ist die Identifizierung von Verbindungen. Hierbei ist die Pyrolyse ein wichtiges analytisches Instrument, da die gesamte Matrix untersucht werden kann. Untersuchungen von Bernstein mit der Kombination Py-GC-MS lagen bisher nicht vor.

Das Ergebnis der Pyrolyse zeigt, daß der Bernstein im wesentlichen nicht, wie bisher angenommen wurde, aus zwei monomeren Bausteinen, der Agathic- und der Cumolsäure, besteht, sondern daß eine Vielzahl von Verbindungen am Aufbau beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde desweiteren das Pyrolyseverhalten einzelner reiner Harzsäuren analysiert. Es zeigte sich dabei, daß die diterpenoiden Harzsäuren bis 500°C thermisch stabil sind und erst bei höheren Pyrolysetemperaturen in bicyclische, zum Teil aromatisierte Substanzen übergehen. Diese Verbindungen konnten wiederum nur bedingt in den Bernsteinproben nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß das Polymer nicht, wie bislang vermutet, überwiegend aus Harzsäuren aufgebaut ist, sondern weitere, noch nicht identifizierte Verbindungen maßgeblich am Aufbau beteiligt sind.

Die als Pyrolyseprodukte der einzelnen Harzsäuren auftretenden Naphthalin- und Dehydronaphthalinverbindungen dienen als Erklärungsmodell für die für fossiles Dammarharz vorgeschlagene Polymerstruktur des Cadin-5,6-en (**150**) [100]. Da in der vorliegenden Arbeit diese aromatischen Verbindungen auch als Pyrolyseprodukte der Harzsäuren identifiziert wurden, besteht es für die Verifizierung der vorgeschlagenen Struktur **150** weiterer Klärungsbedarf.



Allgemein können mit der analytischen Pyrolyse die meisten Erkenntnisse über das gesamte Polymer Bernstein erhalten und somit die Struktur weiter entschlüsselt werden. Hierzu bedarf es deutlich mehr systematische Informationen über das Pyrolyseverhalten von verschiedenen Terpenen und ihren Abbauprodukten, als bisher vorliegen.

Weiterhin konnte in den Vergleichsexperimenten mit reinem Kiefernharz zwar kein Bernstein produziert werden; es konnte aber gezeigt werden, daß Sesquiterpene im Gegensatz zu den Mono- und Diterpenen unter Druck in geringem Ausmaß chemische Reaktionen eingehen. Da bei den löslichen Bestandteilen einigen Massenspektren bislang nicht näher identifizierbare nor-Sesquiterpene zugeordnet werden können <sup>[101]</sup>, stellt sich daher die Frage, ob in den ursprünglichen Harzen, die den Bernstein bildeten, überhaupt Sesquiterpene vorhanden waren. Die nor-Sesquiterpene können auch aus Degradationsprozessen der Diterpene stammen.

Mittels der Massenspektrometrie wurde ein deutlicher Anteil an Diterpenen des Pimarantyps im löslichen Teil des Bernsteins festgestellt, gefolgt von Homologen der Dehydroabietinsäure. Auch dies steht im Widerspruch zur Labdanhypothese, bei der Pimaran- bzw. Abietanverbindungen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

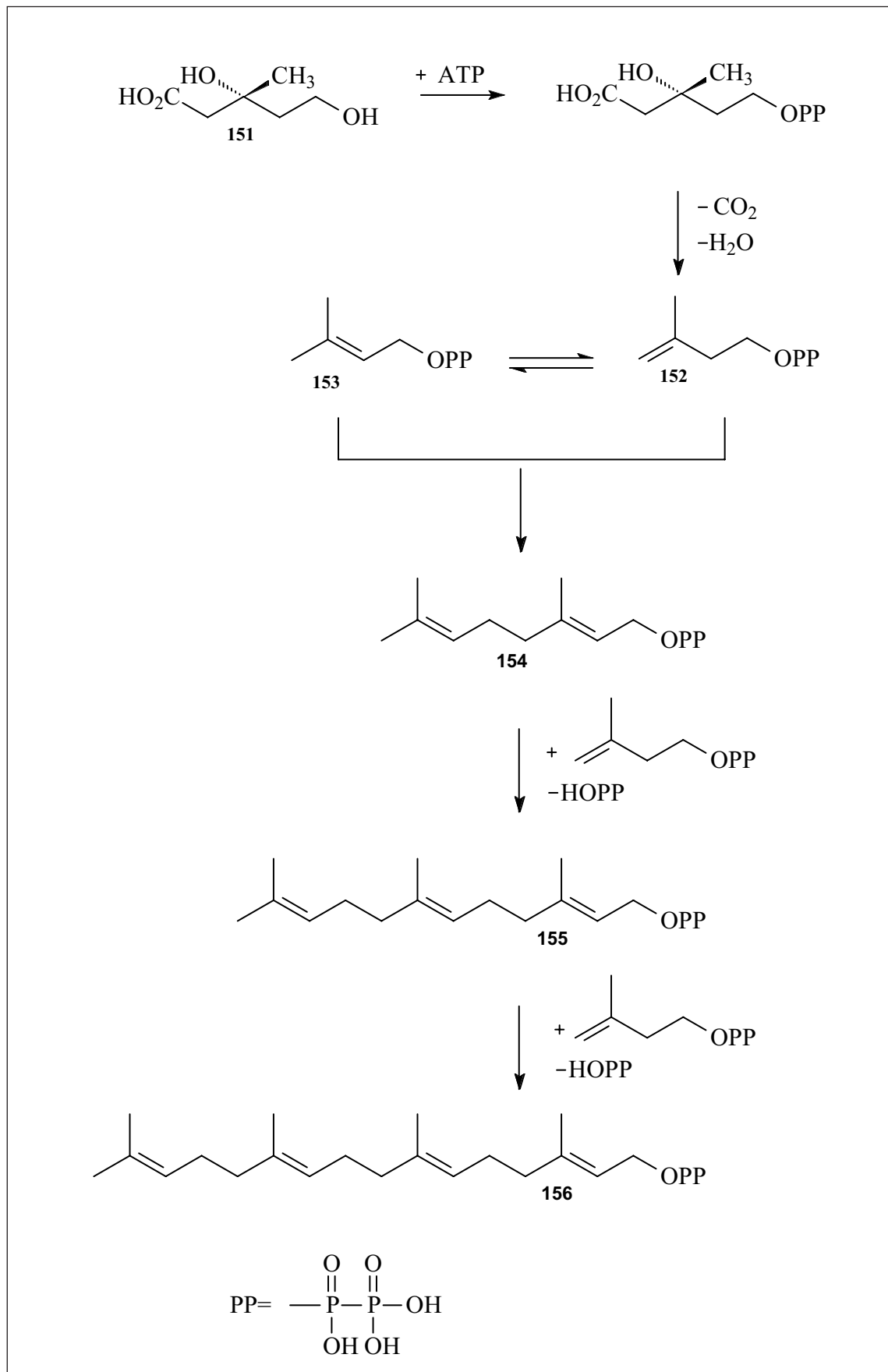
Abschließend wird mit dieser Arbeit über die Identifizierung und Klassifizierung erstmals auf die quantitativ nicht unbedeutende Anzahl von aromatischen Verbindungen im löslichen Bestandteil des Bernsteins hingewiesen.

## 7 Diskussion

Die Struktur des Bernsteins konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig entschlüsselt werden. Es wurde stattdessen auf neue Verbindungsklassen hingewiesen, die vermutlich aus Abbauprozessen der Diterpene stammen und die eine nähere Beleuchtung und Diskussion über Terpenbiogenese und Degradationswege von Diterpenen erfordern.

Aus den Vergleichsexperimenten kann die Erkenntnis gezogen werden, daß die Sesquiterpene unter Druck und Temperatur im Gegensatz zu den Mono- und Diterpenen nicht reagieren. Bislang wurde für die Terpene ein Syntheseweg

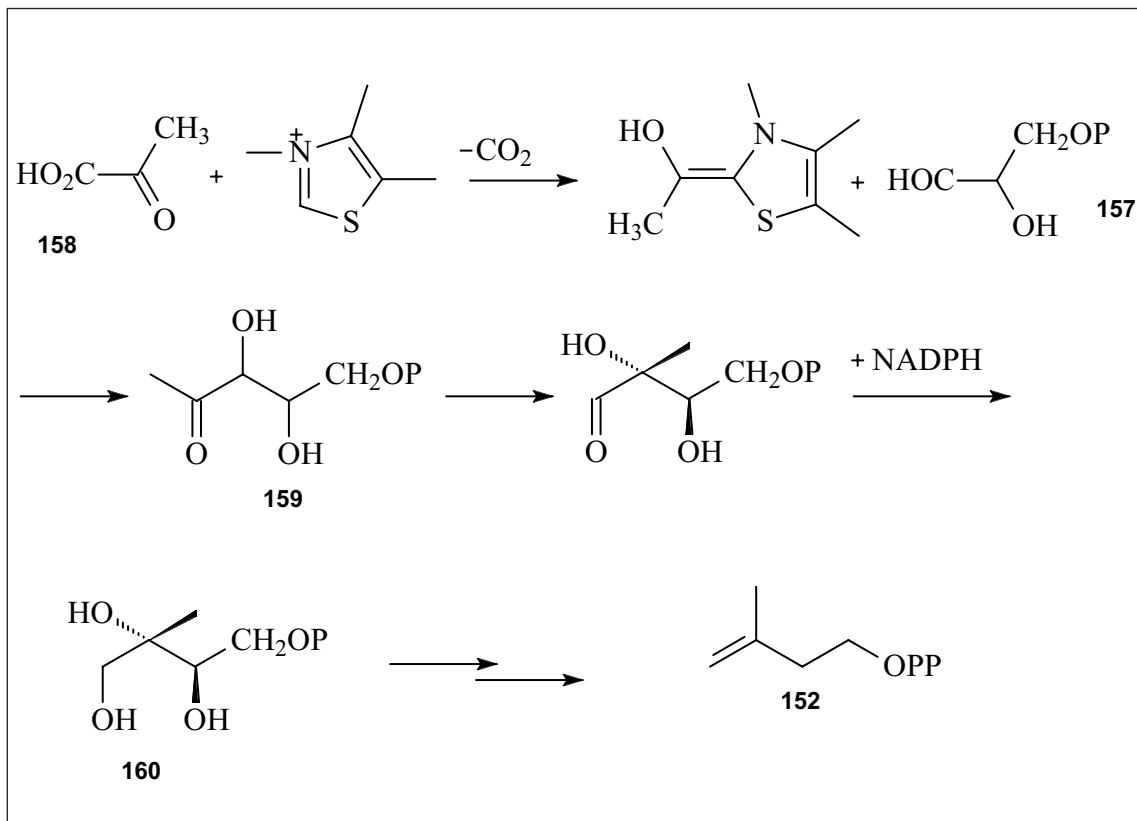




**Abb. 42:** Mevalonsäureweg zur Biosynthese für Terpene

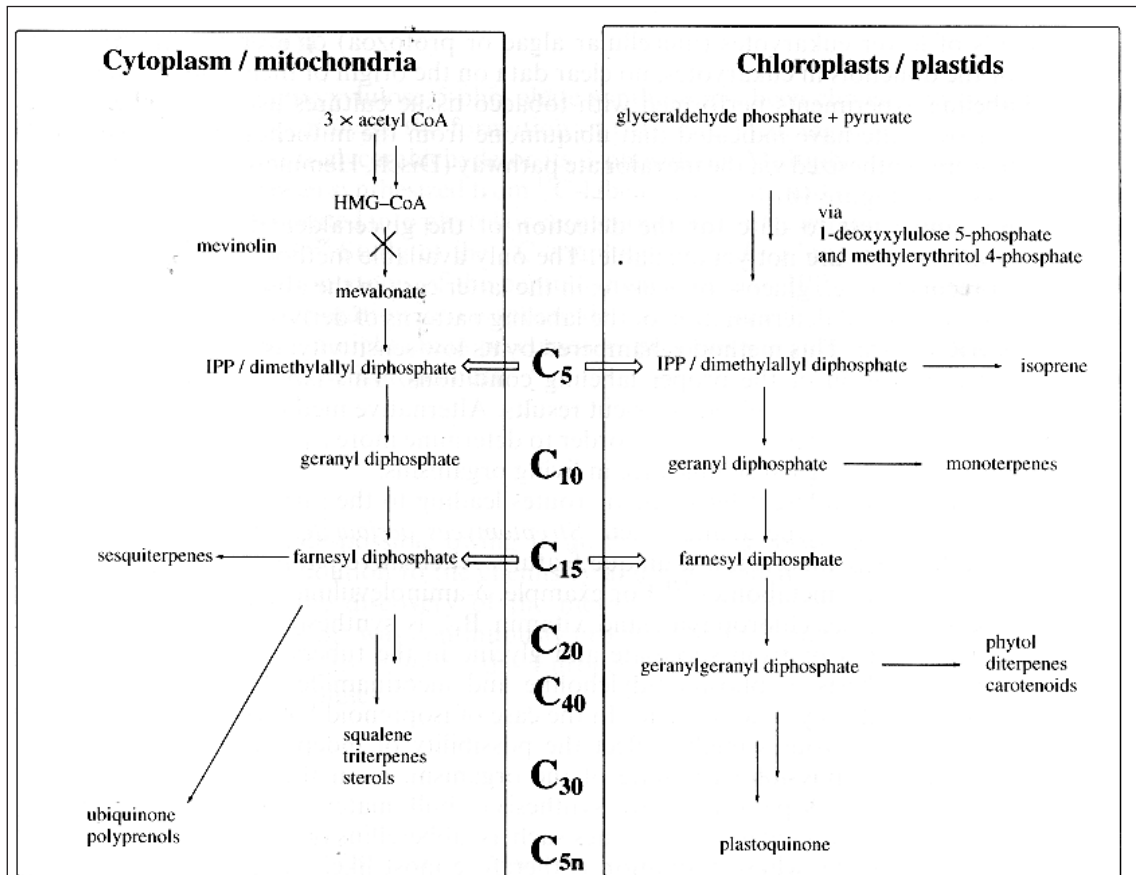
ausgehend von der Phosphorylierung von (R)-Mevalonsäure (**151**) und anschließender Decarboxylierung und Dehydratisierung zum Isopentenylpyrophosphat (**152**) angenommen (Abbildung 42). Die anschließende nucleophile Addition eines Isopentenylpyrophosphates mit einem Dimethylallylpyrophosphat (**153**), welches mit Hilfe der Isomerase aus **151** entsteht, führt zum Geranylpyrophosphat (**154**). Dieses ist der Ausgangsstoff für die Biosynthese der Monoterpene. Eine erneute Verknüpfung von **151** mit Geranylpyrophosphat ergibt Farnesylpyrophosphat (**155**), dem Grundkörper der Sesquiterpen-Biosynthese. Geranylgeranylpyrophosphat (**156**), der Grundbaustein der Diterpene, entsteht aus einer Kopf-Schwanz-Verknüpfung des Farnesylpyrophosphats mit einem weiteren Molekül Isopentenylpyrophosphat [102, 103].

Neuere Untersuchungen zur Biogenese zeigen für die Sesquiterpene von Pflanzen einen von der Mevalonsäure unabhängigen Weg auf, Isopentenylpyrophosphat (IPP) aufzubauen [104]. IPP gilt seit Mitte der 90er Jahre als universaler Baustein für alle isoprenoiden Verbindungen. Wie die Studien an Prokaryonten ergaben, kann IPP über einen weiteren Weg mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat (**157**) und Pyruvat (**158**) als Vorstufen aufgebaut werden. Die Verknüpfung dieser Precursor liefert 1-Deoxypentulose-5-phosphat (**159**), welches durch Energiezufuhr über den homologen Aldehyd zum 2-C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat (**160**) umgewandelt wird. Dieses Hemiterpen ist das zur Mevalonsäure analoge Intermediat, aus dem dann IPP (**152**) gebildet wird (Abbildung 43):



**Abb. 43:** Mevalonsäure-unabhängiger Weg zur Biosynthese von Terpenen

Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit dieser zweite Weg zum IPP auch in höheren Organismen vorkommt. Bislang wurde für die IPP-Synthese in Cytoplasma und Chloroplasten generell der Mevalonsäureweg angenommen. Cytoplasma ist für die Biosynthese der Steroide und Sesquiterpene, Chloroplasten für die der Mono- und Diterpene verantwortlich. Chloroplasten weisen dagegen einen geringen Anteil an Mevalonsäure auf. Die Bildung von IPP kann entgegen der weit verbreiteten Ansicht in der Literatur auch über die Glycerinaldehydphosphat-Pyruvat-Synthese verlaufen. Demnach ist die Bildung von Sesquiterpenen, die in den Cytoplasmen nach dem Mevalonmechanismus produziert werden, unabhängig von der Synthese der Mono- und Diterpene nach dem anderen vorgestellten Biosyntheseweg in den Chloroplasten (Abbildung 44).

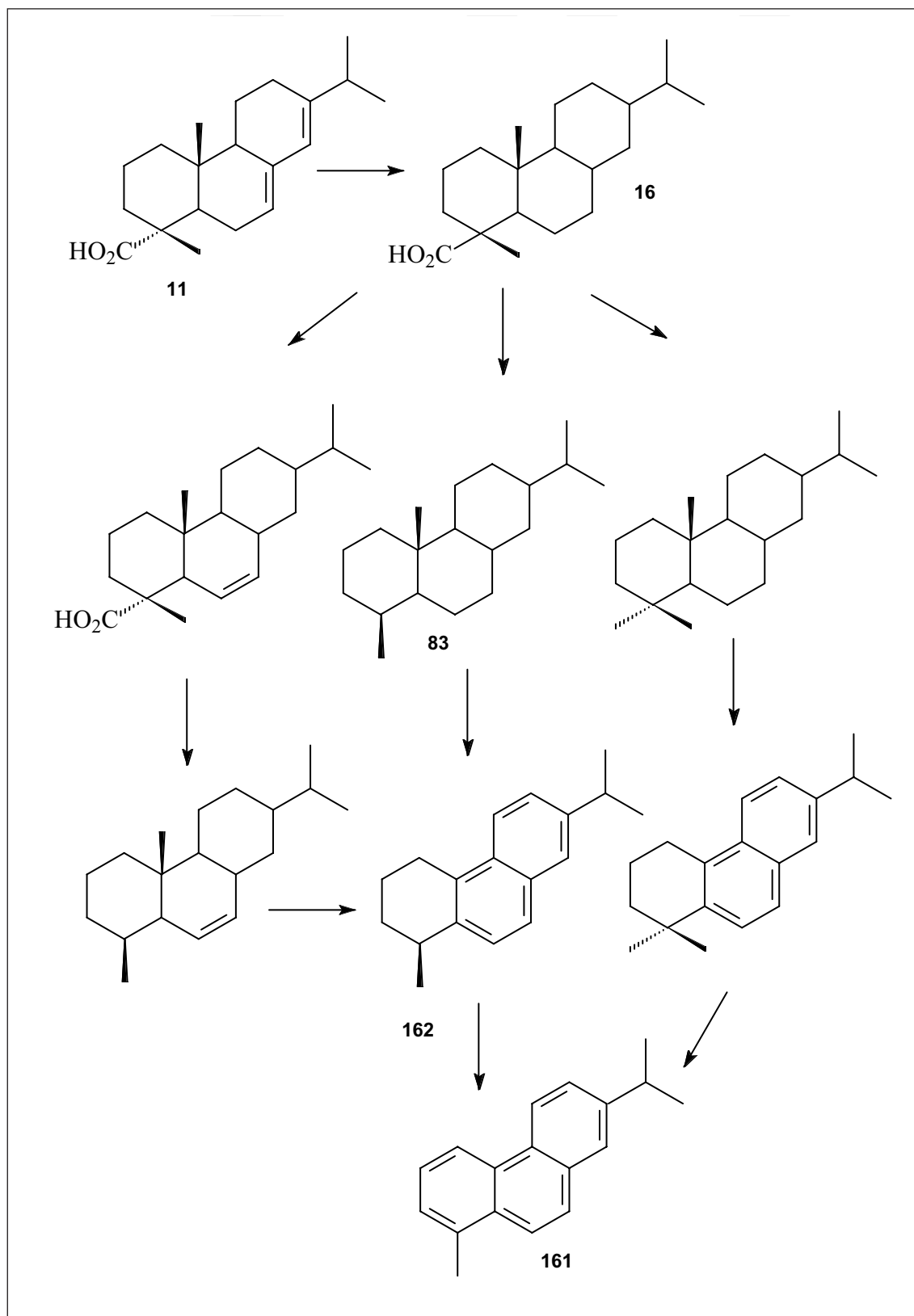
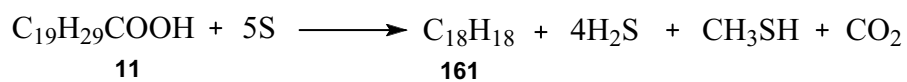


**Abb. 44:** Schematische Darstellung der Synthesewege von Terpenen in höheren Organismen [104]

Diese unterschiedlichen Synthesewege können als Erklärungsmodell für die Abwesenheit von Sesquiterpenen im Bernstein herangezogen werden. Möglicherweise wurde das bernsteinbildene Baumharz im Wesentlichen in Chloroplasten und Plastiden gebildet, so daß es nur wenig Sesquiterpene enthielt. Nach den Ergebnissen der Vergleichsexperimente hätten in den löslichen Extrakten Sesquiterpene identifiziert werden müssen, sofern welche im ursprünglichen Harz vorhanden gewesen wären. Für die Paleobotaniker bedeutet dies, daß alleine aus der Kenntnis über die einzelnen Inhaltsstoffe im Bernstein noch keine weiteren Rückschlüsse auf die Baumart zu ziehen sind. Hier sind noch zahlreiche chemotaxonomische Untersuchungen von Harzen und weitere Untersuchungen zu den Biosynthesen von Terpene in Koniferen - unabhängig von der Analyse des Bernsteines - notwendig.

Unabhängig von der Biosynthese ist für die Entschlüsselung des Bernsteins die Biodegradation der Diterpene von großer Bedeutung: Ausgehend von einer Hypothese [105] aus dem Jahre 1903 wird in zahlreichen Literaturstellen auf den anaeroben Abbau der Abietinsäure (**11**) zu Reten (**161**) hingewiesen [106]

(Abbildung 46):

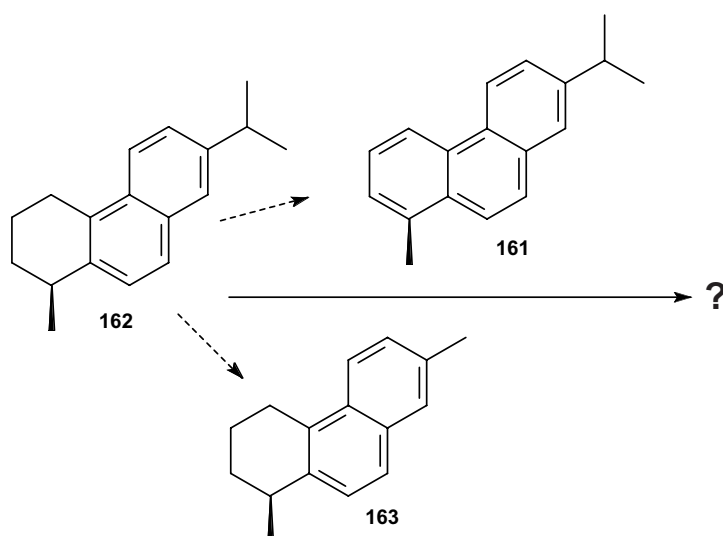


Die einzelnen Stufen des Abbaus von Abietinsäuren und weiteren Harzsäuren des Pimaran- und Labdantyps wurden unter Laborbedingungen, z. B. unter katalytischen Bedingungen mit Palladium/Kohlenstoff oder unter Ozonolysebedingungen, beschrieben [105] und seither wird darauf Bezug genommen. Die Anwesenheit von Reten in fossilen Proben neben der Abietinsäure reicht als einziger Anhaltspunkt aus, um diesen Degradationsweg zu verifizieren.

Dagegen spricht der in diesen Proben quantitativ geringe Anteil an Reten im Vergleich zu den ebenfalls vorliegenden Harzsäuren.

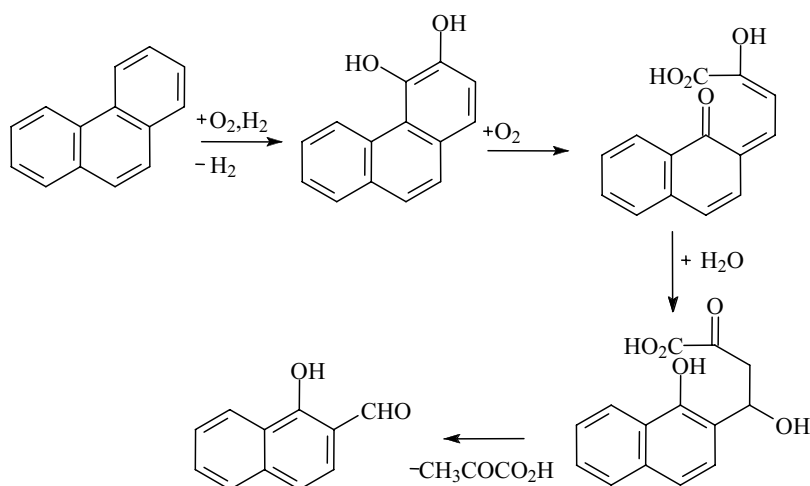
In den hier untersuchten löslichen Extrakten konnte kein Reten nachgewiesen werden. Die vorhandene Menge an Reten ist möglicherweise zu gering. Auffällig ist dagegen der hohe Anteil an Dehydroabietinsäure und seinem Abbauprodukt **83**. Die Decarboxylierung scheint eine wichtige Rolle bei der Degradation zu spielen, wie einige homologe Reihen zeigen. Weiterhin kann mit dem Retenmodell der quantitativ sehr hohe Anteil an bicyclischen, aromatischen Verbindungen in den löslichen Extrakten nicht erklärt werden.

Neuere Untersuchungen an Mikroorganismen und ihr Verhalten gegenüber deuterierten Abietin- und Pimaransäurehomologen unter anaeroben Bedingungen zeigen einen neuen Aspekt auf [107, 108, 109, 110]: Mikroorganismen, die Harzsäuren abbauen können, sind in der Natur weit verbreitet. Hierzu zählen sowohl Bakterien als auch Pilze. Der Nutzen dieser Abbauprozesse für die Mikroorganismen ist bisher noch nicht erklärt, da anscheinend die Degradation der Harzsäuren weder als Kohlenstoffquelle noch als Energielieferant dient. Systematische Inkubationen von Mikroorganismen auf deuterierten Harzsäuren über einen Zeitraum von 264 Tagen zeigen einen Abbau der Abietinsäure (**11**) über die Dehydroabietinsäure (**16**) zu geringen Mengen an Dehydroabietin (**83**) als Transformationsprodukt. Die Hauptkomponente dieser Transformationsprozesse ist Tetrahydroreten (**162**). Soweit stimmen die Degradationsmodelle überein. Der entscheidende Unterschied liegt in dem weiteren Abbauprozess von **162**. Aus den Experimenten mit den Mikroorganismen konnte nur ein sehr geringer Abbau zu Reten (**161**) von 1,1 % festgestellt werden. Dies stimmt mit den geringen Mengen an Reten, die in der Literatur für fossile Harze publiziert sind, überein. Eine ebenfalls geringer Anteil von **162** wird zu Methyltetrahydrophenanthren (**163**) degradiert. Der Hauptanteil wird zu unbekannten, bislang nicht identifizierten Verbindungen weiter abgebaut:

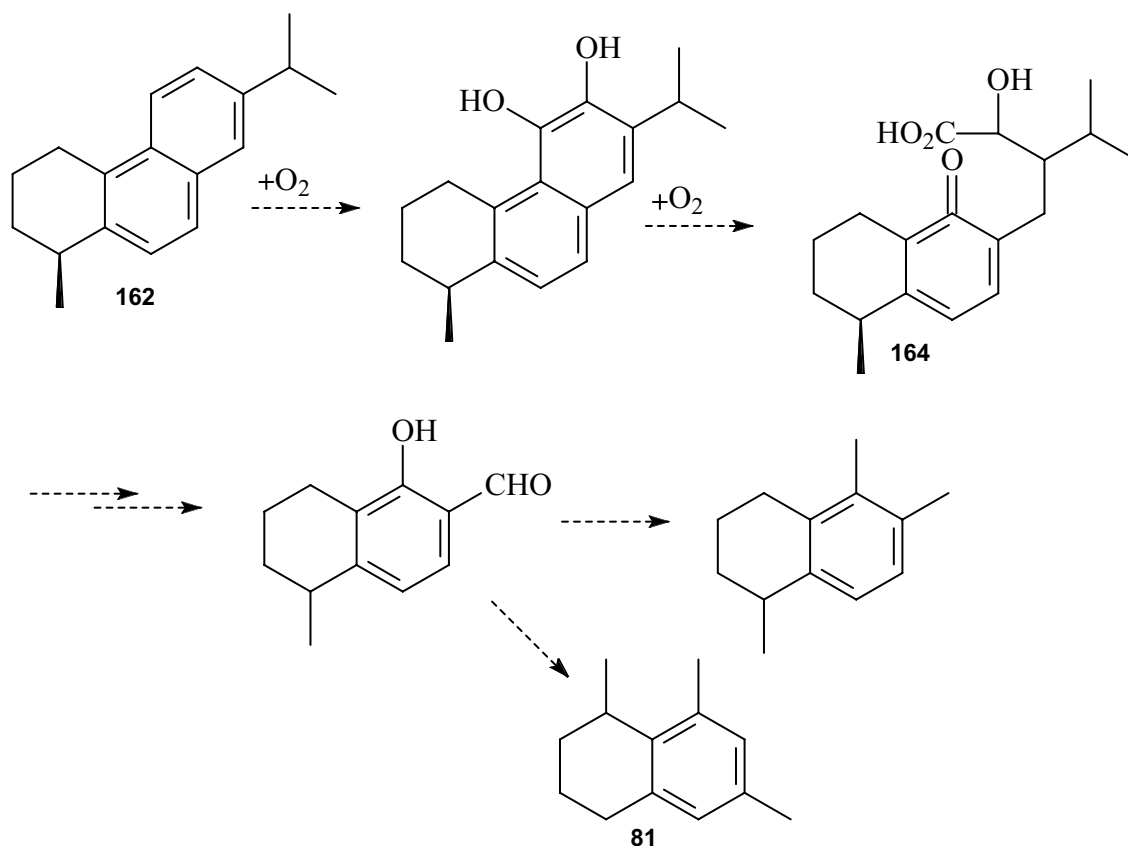


Weitere Experimente hierzu sind bisher nicht publiziert. Deutlich besser beschrieben und über einen längeren Zeitraum bearbeitet sind dagegen die anaeroben Abbauewege von polycyclischen Kohlenwasserstoffen (PAK) [111, 112, 113, 114]:

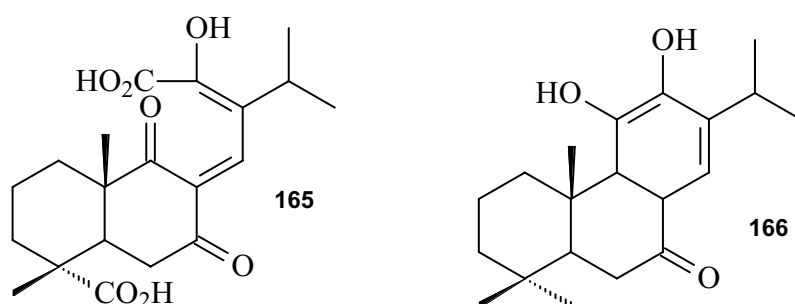
Unter anaerober Degradation werden allgemein Reaktionen unter Abwesenheit von molekularem Sauerstoff verstanden; dies bedeutet nicht unbedingt, daß kein sauerstoffhaltiger Metabolismus aus alternativen Elektronenakzeptoren stattfinden kann. Die wichtigsten Schritte beim Abbau von polycyclischen Aromaten sind Demethoxylierung, Decarboxylierung und Dehydroxylierung. Hierbei können neben Ringspaltungen auch Eliminierungsreaktionen von Substituenten stattfinden. Wie ein derartiger Degradationsprozess aussieht, ist am Beispiel von Phenanthren dargestellt. Der Abbau kann weiter über die Phthalsäure als Zwischenprodukt bis zur vollständigen Spaltung des Ringes führen:



In den löslichen Extrakten des Bernsteines konnten keine derartigen sauerstoffhaltigen Verbindungen eindeutig identifiziert werden. Stattdessen wurden reine polycyclische Kohlenwasserstoffe wie **81** und **82** detektiert. Ein möglicher Weg dorthin könnte wie folgt aussehen:



Unterstützt wird diese Hypothese durch die Identifikation von Verbindungen wie **165** und **166**, die in dem ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärten aeroben Degradationsmechanismus der Abietinsäure entdeckt wurden:



Abschließend bleibt noch anzumerken, daß das Polymer Bernstein aus einer viel komplexeren Struktur besteht, als bislang angenommen. Die diterpenoiden



Harzsäuren scheinen dabei eine wichtige Schlüsselfunktion im Polymerisationsprozeß zu besitzen. Hier besteht noch viel Klärungsbedarf über den eigentlichen Degradationsprozeß. Die Abbauprodukte würden erklären, warum die Polymerisationsexperimente von reinen Harzen im Autoklaven nicht so ohne weiteres zum Bernstein führten.

Die Struktur besteht vermutlich aus einem dreidimensionalen Netzwerk aus Abbauprodukten der Harzsäure, ihrer Derivate, wie zum Beispiel den Bornylester und den Harzsäuren selber. Die Verknüpfung erfolgt wohl größtenteils über reine Kohlenstoffbindungen, was die geringe Löslichkeit erklären würde.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Arbeitsmittel und -geräte

#### Allgemeine Arbeitsmethoden:

Die verwendeten Lösungsmittel wurden kommerziell mit dem Reinheitsgrad Suprasolv oder Ultrasolv von der Firma Merck bezogen und, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die wasserfreien Chemikalien wurden nach üblichen Methoden getrocknet <sup>[115]</sup>. Es wurden Chemikalien der Firmen Merck, Aldrich, Lancaster und Acros verwendet. Die Harzsäuren wurden von der Fa. Helix Biodata, Kanada bezogen.

#### Analytische Dünnschichtchromatographie (DC):

DC-Plastikfolien "Polygram Sil G/UV<sub>254</sub>" (0.25 mm) der Fa. Macherey, Nagel & Co.

#### Präparative Dünnschichtchromatographie (PDC):

Merck Kieselgelplatten 60 auf Aluminium, 20\*20 cm, 0.25 mm Schichtdicke und Merck Kieselgelplatten 60 auf Glas, 20\*20 cm, 2 mm Schichtdicke.

Die Platten wurden zuvor mit Methanol gereinigt. Als Laufmittel für die Fraktionierung der Bernsteinextrakte wurde ein Gemisch aus Hexan /Diethylether 9/1 verwendet. Alternativ wurden mit Dichlormethan als Laufmittel die gleichen Ergebnisse erzielt. Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd- bzw. Molybdatophosphatlösung.

Für die Imprägnierung mit Silbernitrat wurde das Kieselgel in einer 10 %- Silbernitrat-Lösung (10 Gew. % AgNO<sub>3</sub> bezogen auf das Kieselgel) in entionisierten Wasser für eine halbe Stunde eingelegt und anschließend getrocknet. Der Vorgang wurde dreimal mit je einer Platte wiederholt. Die Detektion erfolgte mit einer ethanolischen Schwefelsäure.

#### Flash-Säulenchromatographie (SC):

Kieselgel 60 (70-230 mesh) der Fa. Merck bzw. Sephadex LH-20 der Fa. Pharmacia Biotech. Es wurde ca. 1,5 g Sephadexmaterial über Nacht mit

Methanol gequollen. Bei der ersten Sephadexsäule wurde reines THF als Laufmittel verwendet. Bei der zweiten Säule wurde folgender Lösungsmittelgradient angewandt: 50 mL THF/MeOH 1/1, 50 mL THF/Hexan 9/1, 50 mL THF/Hexan 1/1, 50 mL THF. Auf der zweiten Säule konnte mit den ersten 100 mL eine bessere Auftrennung erzielt werden als auf der ersten Säule. Danach wurden keine weiteren Substanzen in den nachfolgenden Fraktionen mehr detektiert.

Die Imprägnierung des Flash-Kieselgels erfolgte analog der Vorschrift für die Dünnschichtchromatographie. Es wurde bei stets mit 0,3-0,5 bar Überdruck chromatographiert.

### **Schmelzpunkt (Schmp.)**

Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. Reichert mit geeichtem Thermometer. Die Werte sind unkorrigiert.

### **Differential Scanning Kalorimeter (DSC):**

Rheometric Scientific DSC SP+. In einem offenem Standard-Kalorimetertiegel aus Aluminium wurden ca. 5 mg eingewogen und unter Stickstoff mit einer Heizrate von 10 K/min untersucht.

**Elementaranalysen** wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig mit einem Elemental Analyser 1106 der Fa. Carlo Erba durchgeführt. Der Fehler beträgt absolut 0.3 %.

Die Extraktionen wurden mit einer Haushaltsmikrowellengerät von Siemens in geschlossenen Überdruckbehältern aus Teflon durchgeführt. Dabei wurden 2 bis 3 g der Proben mit je 10 mL THF je dreimal 15 min bei 90 W extrahiert. Anschließend wurden die Proben mit je 10 mL Dichlormethanolösungen je dreimal 15 min bei 180 W extrahiert. Bei der Probe 9 wurden ca. 40 g auf zwei Teflonbehälter verteilt und anstelle von jeweils 10 mL wurden 20 mL Lösungsmittel eingesetzt.

### **HPLC:**

1. Die präparativen Trennungen wurden an einem Gibson Abimed HPLC-Gerät

mit angeschlossenem UV-Detektor durchgeführt. Als Säule wurde eine Gel-Permeationssäule der Fa. MZ, 60cm, 20 mm I.D., 100 Å Porengröße und 10 mm Partikelgröße eingesetzt. Das Laufmittel war n-Hexan bei einer Flußrate von 20 mL/min. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Es wurden ca. 8 g der Probe 9 in insgesamt 4 Cyclen bei gleichen Analysenbedingungen (Injektionsvolumen 2 mL) aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte alle 30 sec über einen Zeitraum von jeweils 1 h. Dabei wurde die Fraktion **H1** erhalten.

2. Alle weiteren hochdruckflüssigchromatographischen Trennungen wurden an einem Spectra System von Thermoquest, bestehend aus einer Pumpe P4000, einem Autosampler AS3000 und einem Dioden-Array-Detektor SN4000, durchgeführt. Dazu standen die Trennsäulen LiChroCart RP-18 (5 mm Porengröße, 25 cm, 4,0 mm I.D.) und Superspher Si 60 der Fa. Merck (5 mm Porengröße, 25 cm, 4,0 mm I.D.) zur Verfügung. Die Flußrate betrug 1 mL/min. Injiziert wurde von der Lösung H1 jeweils 100 mL über den Autosampler. Als Laufmittel wurde bei der Supersphersäule n-Hexan verwendet. Bei der RP-18-Säule wurde ein Gradientengemisch aus Methanol und entionisiertem Wasser benutzt: 0-15 min MeOH/Wasser 80/20, 15-20 min 85/15, 20-25 min 90/10, 25-40 min 95/5 MeOH/Wasser. Es wurden die Fraktionen **F1-F5** erhalten.

Die **Gefriertrocknung** erfolgte mit einem Gerät von Christ Alpha 1-2.

### **Gaschromatographie (GC):**

Die gaschromatographischen Analysen wurden an Fused Silica Kapillarsäulen mit unpolarer Phase in unterschiedlichen Gerätekombinationen durchgeführt:

Gaschromatographie mit FID-Detektion:

Gaschromatograph: Top 8000 der Fa. CE Instruments

Injektoren: Split/Splitless-Injektor, Splitverhältnis 1:20, Injektortemperatur 250 °C

PTV-Injektor der Fa. Gerstel (KAS 3), Splitverhältnis 1:20,

Temp.Programm: 45 °C (5 min isotherm) bis 400 °C mit 10 °C/min

Trennsäule: BPX-5, 25 m, 0.22 mm I.D., 0,25 mm Filmdicke

Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion:

Gerätekombination: HP6890 und HP5973 MSD

Injektoren: siehe oben

Trennsäule: BPX-5, 25 m, 0,22 mm I.D., 0,25 mm Filmdicke

Gaschromatographie mit FTIR-Detektion:

Gerätekombination: HP6890 und HP5965A IR

Injektor: Split/splitless, siehe oben

Flow-Cell Temperatur: 280 °C

Trennsäule: HP5, 30 m, 0,32 mm, 0,25 mm Filmdicke

### **Pyrolyse (Py):**

Für die **Pyrolyse** stand ein transportabler Pyrojector II der Fa. SGE mit einem Festkörperaufsatz zur Verfügung, der an das Injektorsystem des jeweiligen Gaschromatographen gekoppelt wurde. Dabei stand für das System Py-GC-FID Wasserstoff, für die gekoppelten Systeme Py-GC-MS und Py-GC-FTIR Helium als Trägergas zur Verfügung.

**NMR-Spektren** wurden in deuteriertem Benzol vermessen. Dazu standen ein Bruker AC 200  $^1\text{H}$  (200,13 MHz),  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz) und ein Bruker PRX 400  $^1\text{H}$  (400,13 MHz)  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz) zur Verfügung.

Die  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden  $^1\text{H}$ -Breitbandentkoppelt aufgenommen und die Spinmultiplizität mit der DEPT-Technik bestimmt. Für die Multiplizität wurden folgende Abkürzung benutzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartet, m = Multipllett, bs = breites Signal

Folgenden Personen möchte ich an dieser Stelle herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten, seine stete Diskussionsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Wolfgang Weitschat für die großzügige Überlassung der Bernsteine, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Dr. Johannes Koller für die Anregung zu diesem Thema und sein stets offenes Ohr. Desgleichen möchte ich mich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei den Herren Prof. Dr. Wittko Francke und Prof. Dr. Wilfried A. König sowie bei Frau Ursula Baumer bedanken.

Herrn Dr. V. Sinnwell und seinen Mitarbeitern danke ich besonders für ihren Einsatz bei der Vermessung meiner NMR-Proben.

Allen MitarbeiterInnen im Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre, insbesondere bei Herrn Markus Deichmann.

Herrn Matthias Wobst für die großzügige Versorgung mit Laborbedarf jeglicher Art; Herrn Dr. H.-H. Johannes für die Fluoreszenzmessungen.

Den Herren W. Küstermann und H. Schöpfer für die Glasbläserarbeiten.

Den Herren T. Kaschner, M. Kruse und R. Gruß für ihren stets besonderen Einsatz bei der Beschaffung von Chemikalien.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Ernst Plaß, Frau Dr. Aurelia Reckziegel und Frau Ulrike Muus für ihre stets herzliche Gastaufnahme in ihren Laboren und für ihre uneigennützigte Hilfsbereitschaft bedanken.

## 8.2 Beschreibung der Proben

Alle Proben mit Ausnahme der Proben 4 und 11 stammen aus Sedimentschichten der letzten Eiszeit (Ostsee).

**Probe 1 (P1):** hellgelb, leicht getrübt ohne Verwitterungskruste, 5,375 g.

**Probe 2 (P2):** gelb, trübe, leicht angewittert, 4,061 g.

**Probe 3 (P3):** gelb-orange, klar ohne Verwitterungskruste, 6,713 g.

**Probe 4 (P4):** gelb, trübe ohne Verwitterungserscheinungen. Stammt aus Sedimenten der blauen Erde, 4,984 g.

**Probe 5 (P5):** gelb-orange, leicht trübe, wenig verwittert, 7,374 g.

**Probe 6 (P6):** orange, klar, keine Verwitterungserscheinungen, 5,371 g.

**Probe 9 (P9):** orange, überwiegend trübe mit einigen klaren und einigen hellgelb-milchigen Einschlüssen. Auf der einen Seite stark verwittert. 43 g.

**Probe 11 (P11):** gelb-orange, mit starker Verwitterungskruste, stammt aus den Sedimenten der blauen Erde. Es wurde für Pyrolyseuntersuchungen nur die

Kruste analysiert.

Die **Vergleichsexperimente** wurden mit einem Kiefernharz Ref. 910397 der Fa. Kaderer durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwischen 3-4 g Harz autoklaviert.

### 8.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### **Methylierung acider Verbindungen:**

In einer speziellen Destillationsapparatur (MNNG Diazomethane-generation apparatus, Aldrich) wurde 0,5 mg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff vorsichtig mit 15% Kalilauge bis zur Beendigung der Gasentwicklung versetzt. Das gasförmige gelbe Diazomethan wurde in mit flüssigem Stickstoff gekühlten abs. Diethylether aufgefangen. Diese Lösung wurde zu den Proben gegeben. Nach einer Stunde Rühren bei RT wurde die Probelösung auf das ursprüngliche Volumen unter einem leichten Stickstoffstrom eingeengt.

#### **Methylierung acider Verbindungen für die Pyrolyse:**

Zu der Probe von ca. 30 mg wurde 3 mL Tetramethylammoniumhydroxidlösung (25% in H<sub>2</sub>O) gegeben. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum vorsichtig entfernt. Das entstehende polymere Gemisch wurde anschließend direkt im Pyrojector geschmolzen und pyrolysiert.

#### **Ummethylierung von Estern:**

3 mL Methanol werden mit 100 mg Na unter Stickstoff zu Natriumethanolat umgesetzt. Von dem Probenextrakt werden 2 mL bis zur Trockene eingeengt und mit 2 mL abs. Dichlormethan versetzt. Unter Stickstoff werden 2 mL Natriumethanolat zugesetzt und 30 min bei 60 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung mit Pentan extrahiert und getrocknet.

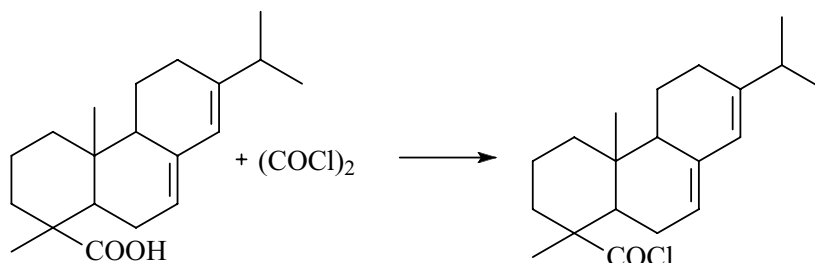
### 8.4 Synthese der Referenzsubstanzen

#### **Darstellung von Abietinsäurechlorid:**

0,208 g (0,687 mmol) Abietinsäure werden in 1 mL abs. Dichlormethan unter Stickstoff suspendiert. Dazu werden 2 mL (23,06 mmol) Oxalylchlorid hinzugegeben und 2 h unter RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit abs. Dichlormethan aufgenommen und die Lösung im Vakuum eingeengt. Der entstandene Rückstand wird insgesamt dreimal mit

Dichlormethan aufgenommen. Anschließend wird im Vakuum das Lösungsmittel wieder entfernt.

Die Säurechloride der Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure werden analog



zu dieser Vorschrift hergestellt.

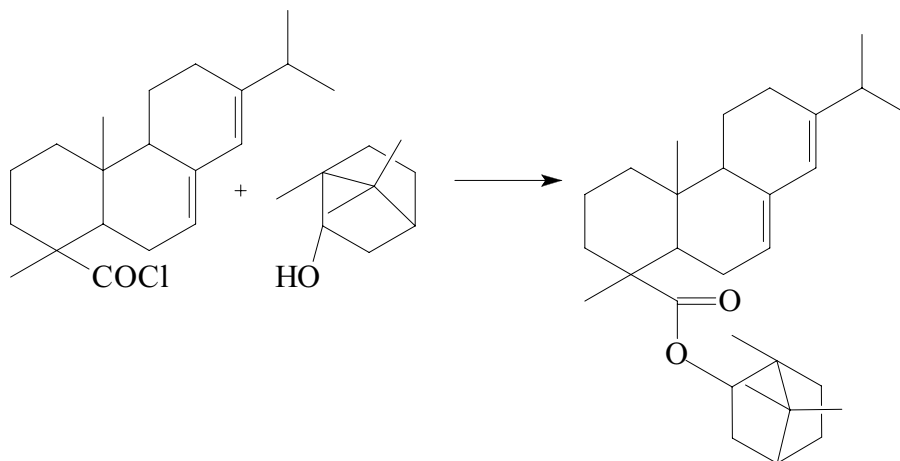
#### Darstellung des Abietinsäurebornylester:

0,108g (0,656 mmol) (-)-Borneol werden unter Stickstoff mit 1 mL abs. Pyridin gelöst. Unter Kühlung wird langsam 3 mL des oben dargestellten Rohproduktes des Abietinsäurechlorids in abs. Dichlormethan hinzuge tropft und 2 h bei RT gerührt. Es entsteht eine orange Lösung. Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung in wenig Eiswasser gegossen und mit konz. HCl angesäuert, dabei fällt das Pyridinsalz aus. Der Niederschlag wird abfiltriert und der Rückstand mit wenig Dichlormethan aufgenommen. Es wurde über Flashfiltration mit wenig Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 0,111 g (39,7 %)

MS: 438 ( $\text{M}^+$ ), 137(B) Spektrum siehe Anhang

Die entsprechenden Bornylester der Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure wurden analog dazu hergestellt. Die dazugehörigen Massenspektren sind im



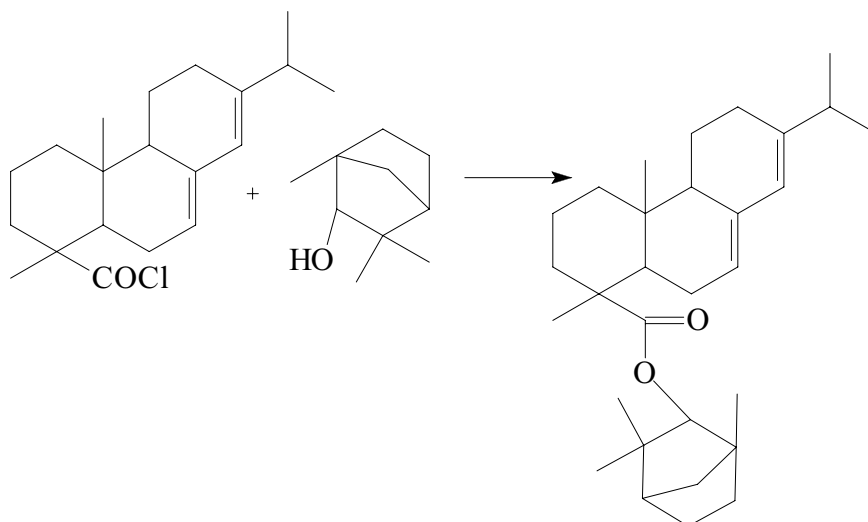


Anhang abgebildet.

Darstellung des Abietinsäurefenchylester:

Dieser Ester wurde analog zu dem Bornylester dargestellt. Anstelle von Borneol wurden 0,105 g (0,683 mmol) (+)-Fenchol eingesetzt.

Ausbeute: 0,126 g (43,8 %)



MS: 438 ( $\text{M}^+$ ), 81(B) Spektrum im Anhang

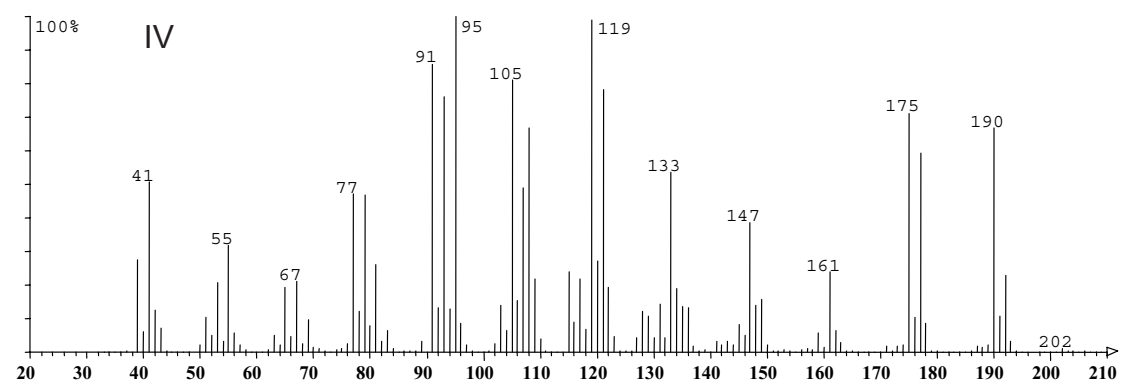
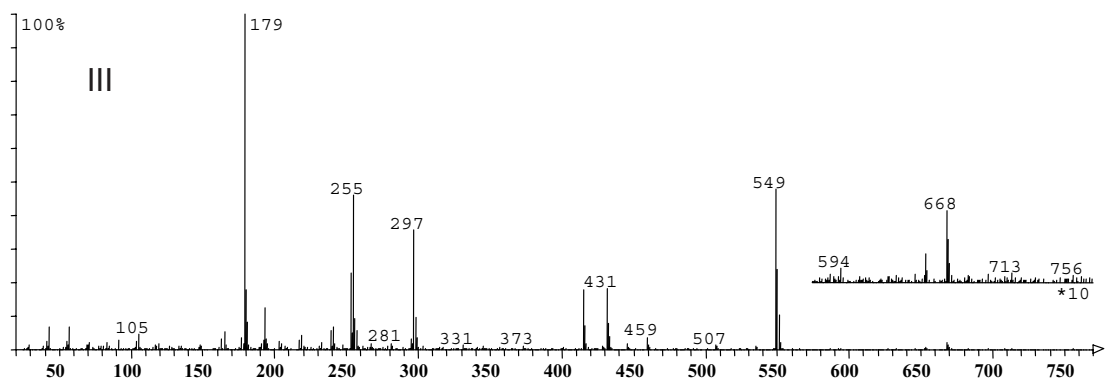
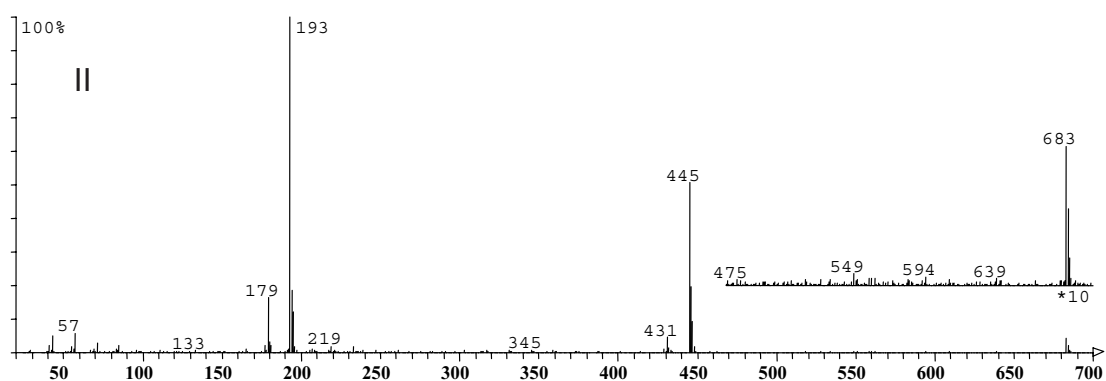
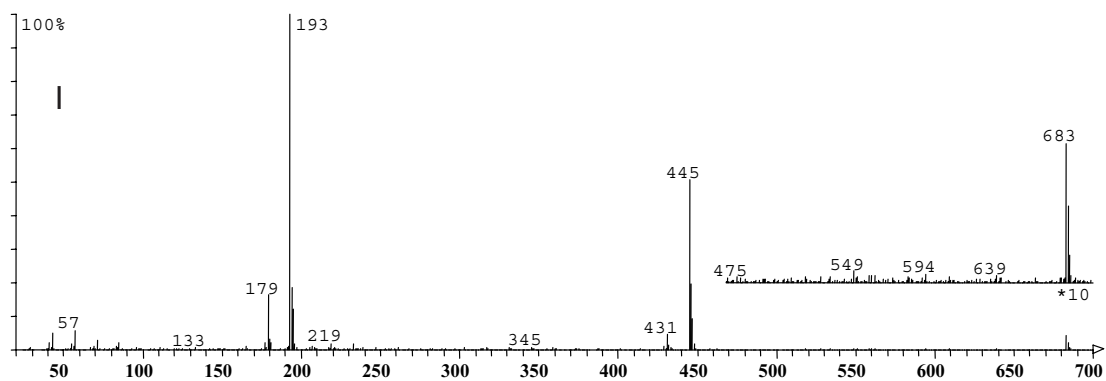
## 9 Literaturverzeichnis

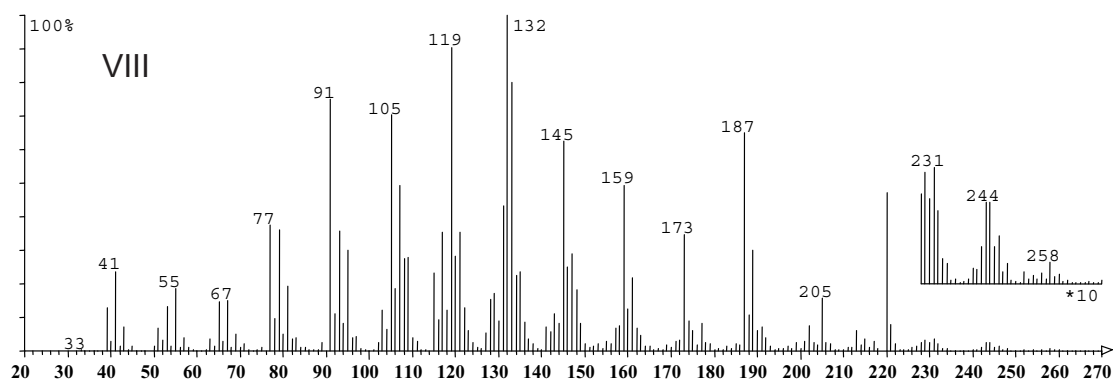
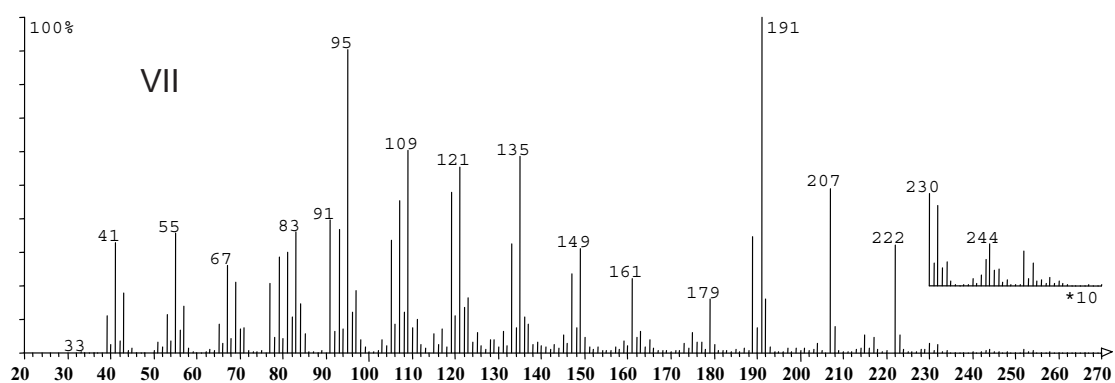
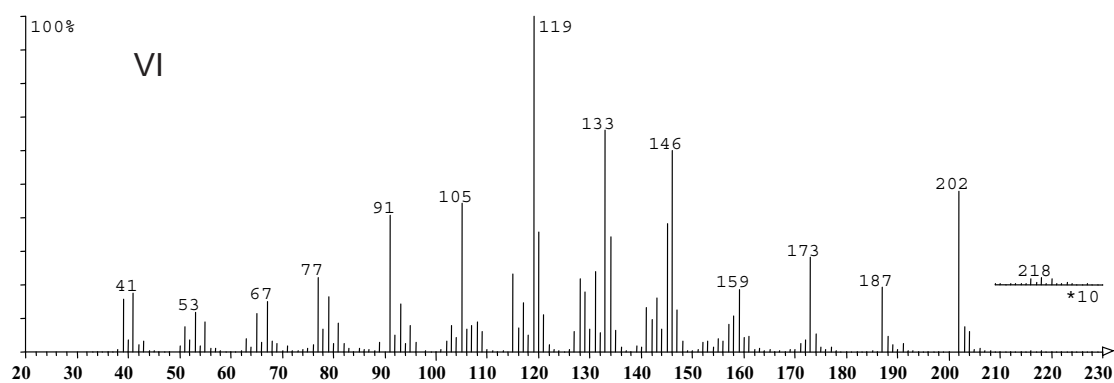
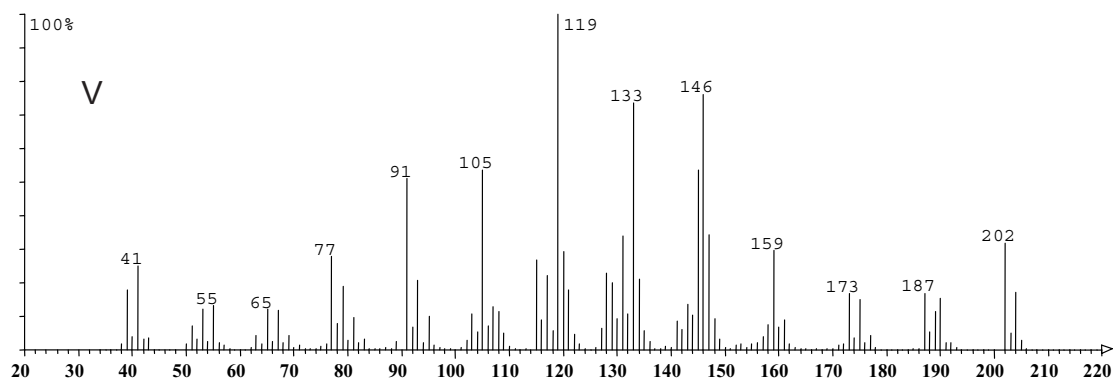
- [1] H. Fraquet, *Amber*, Butterworths, London, **1987**
- [2] M. Ganzelewski, *Aussehen und Eigenschaften von Bernstein*, in *Bernstein, Tränen der Götter*, Hrsg.: M. Ganzelewski, R. Slotta, Glückauf GmbH, Bochum **1996**, S. 19-25
- [3] G.O. Poinar Jr., *Life in Amber*, Stanford University Press, Stanford **1992**
- [4] J. Grzonkowski, *Bernstein*, Hamburg **1996**
- [5] [www.brost.se/bilder/vyhort/vyhort2.jpg](http://www.brost.se/bilder/vyhort/vyhort2.jpg)
- [6] G. Krumbiegel, B. Krumbiegel, *Bernstein-fossile Harze aus aller Welt*, Fossilien Sonderband 7, Goldschneck **1994**
- [7] M. Ganzelewski, *Aussehen und Eigenschaften von Bernstein*, in *Bernstein, Tränen der Götter*, Hrsg.: M. Ganzelewski, R. Slotta, Glückauf GmbH, Bochum **1996**, S. 11-18
- [8] E. Probst, *Deutschland in der Urzeit*, Orbis Verlag, München **1999**
- [9] S.M. Stanley, *Historische Geologie*, Spektrum Verlag, Heidelberg **1994**,
- [10] W.Weitschat, *Metalla Sonderheft*, **1997**, 71-84
- [11] B. Kosmowska-Ceranowicz, *Spuren des Bernsteins*, Ausstellungskatalog, Bielefeld **1991/92**
- [12] K. Andrée, *Der Bernstein und seine Bedeutung in Natur- und Geisteswissenschaften, Kunst und Kunstgewerbe, Industrie und Handel*, Gräfe & Unzer, Königsberg **1937**
- [13] K. Andrée, *Der Bernstein. Das Bernsteinland und sein Leben*, Kosmos Verlag, Stuttgart **1957**
- [14] W. Bölsche, *Im Bernsteinland*, Kosmos Verlag, Stuttgart 1927
- [15] D. Schlee, *Aktuelle Geoinformation*, **1986**, 65-80
- [16] H. Conwentz, *Monographie der baltischen Bernsteinbäume*, Williams & Norgate, Danzig **1890**
- [17] J. Langenheim, *Science* **1963**, 163, 1157
- [18] R. Reinike, *Bernstein - Gold des Meeres*, Hinstorff, Rostock **1990**
- [19] R.v. Bismarck, *Bernstein - Gold des Nordens*, Wanderndes Museum der Christian-Albrecht-Universität Kiel, 3, Neumünster **1987**
- [20] B. Kosmowska-Ceranowicz, A. Kohlman-Adamska, I. Grabowska, *Metalla Sonderheft*, **1997**, 5-18
- [21] U. Lund Hansen, *Archäologie in Deutschland*, **1997**, 3, 18-23
- [22] *Lexikon des Mittelalters*, **1980**, 1, 2010-2012
- [23] A. Spekke, *The Ancient Amber Routes and the Geological Discovery of the Eastern Baltic*, Goppers, Stockholm **1957**
- [24] R.C.A. Rottländer, *Dissertation*, Universität Köln, **1975**
- [25] C. Beck, S. Shennan, *Oxbow Monograph 8*, Oxford **1991**
- [26] *Reallexikon des Mittelalters*, Bd. 2, Stuttgart, **1996**
- [27] G. Weisgerber, *Vor- und Frühgeschichtliche Nutzung des Bernsteins*, in *Bernstein, Tränen der Götter*, Hrsg.: M. Ganzelewski, R. Slotta, Glückauf GmbH, Bochum **1996**, S. 413-425
- [28] Plinius Sec. d.Ält., *Naturalis Historiae 1.XXXVII*, in der Übersetzung von J. Hopp, Darmstadt **1994**, 33-47

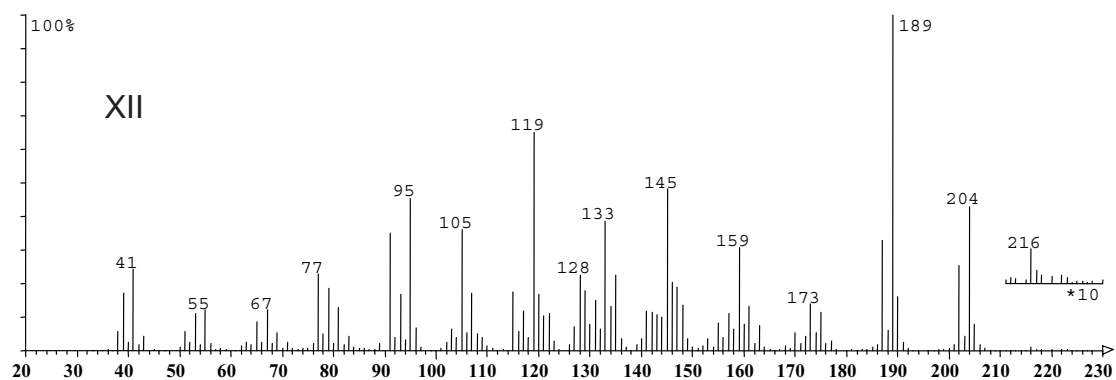
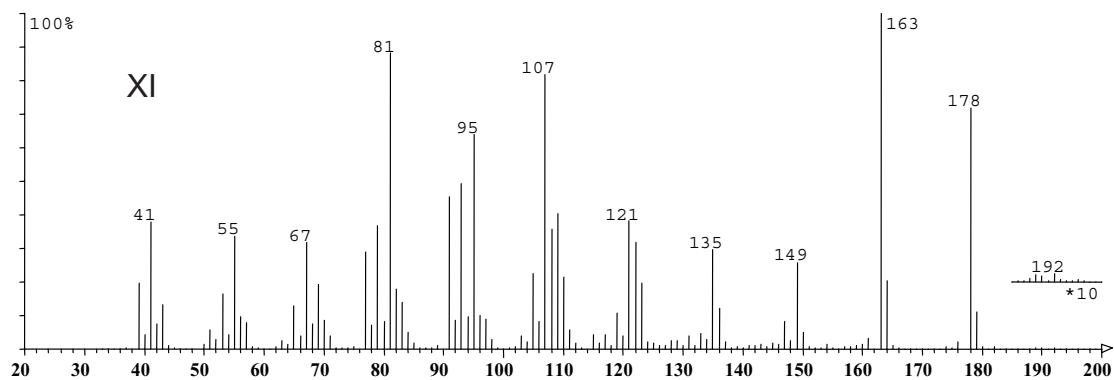
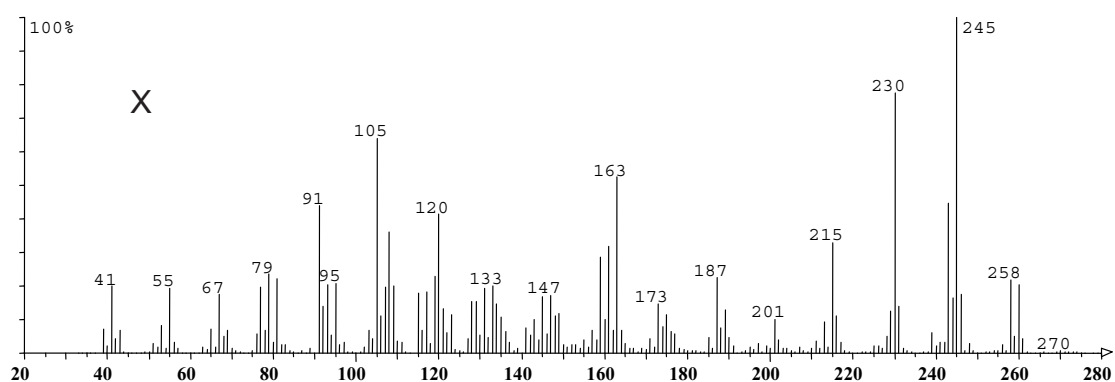
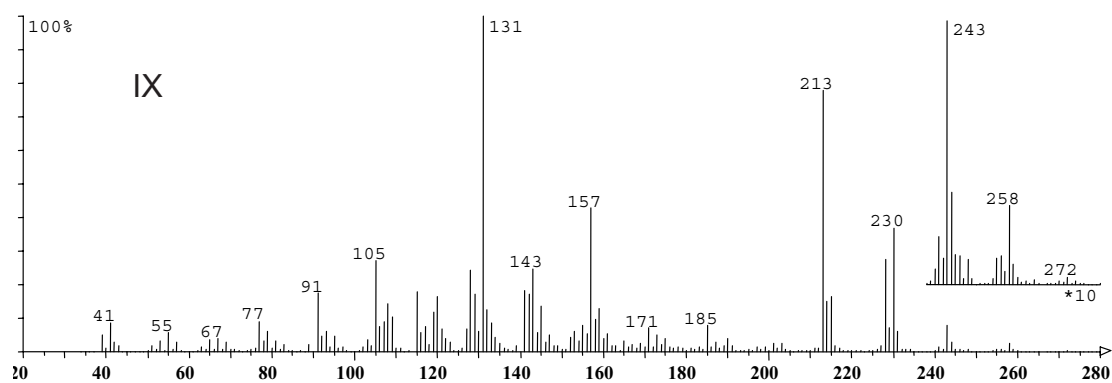
- [29] O. Pelka, *Bernstein*, Schmidt & Co., Berlin **1920**
- [30] K. Andrée, *Der Bernstein. Das Bernsteinland und sein Leben*, Kosmos Verlag, Stuttgart **1957**, 94
- [31] G. Acricola, *De natura fossilium libri X, Über den Bernstein*, 237-246 in der Übersetzung von G.Fraustadt, H. Prescher, Berlin **1958**, 99-111
- [32] R.C.A. Rottländer, *Chemie in unserer Zeit*, **1974**, 3, 78-83
- [33] C. Beck, *Die Naturwissenschaften*, **1972**, 59, 294-298
- [34] E. Aweng de Jong, *Archiv für Pharmazie*, **1894**, 232, 660-668
- [35] A. Tschirch, E. Aweng de Jong, *Helv. Chim. Acta*, **1923**, 6, 214
- [36] C. Beck, *Archaeometry*, **1965**, 8, 96-109
- [37] C. Beck, E. Wilbur, S. Meret, *Nature*, **1964**, 201, 256-257
- [38] C. Beck, *Appl. Spec. Rev.*, **1986**, 22, 57-110
- [39] S.Savkevich, I.A. Shaks, *J. Appl. Chem. USSR*, (Engl. Tranlation), **1964** 37 (5), 1117-1119
- [40] S. Savkevich, *Phys. Chem. Minerals*, **1981**, 7, 1-4
- [41] J. Lambert, J.S. Frye, G.O. Poinar, *Geoarchaeology*, **1990**, 5 (1), 43-52
- [42] J. Lambert, C. Beck, J.S. Frye, *Archaeometry*, **1988**, 30 (2), 248-263
- [43] A. Martínez-Richa, R. Vera-Graziano, A. Rivera, P. Joseph-Nathan, *Polymer*, **2000**, 41, 743-750
- [44] G. Heck, *Acta Praehistoria*, 1996, 28, 154-161
- [45] J. Koller, U. Baumer, *Metalla Sonderheft*, **1997**, 85-102
- [46] V. Mosini, M.L. Forcellese, R. Nicoletti, *Phytochemistry*, **1980**, 19, 679-680
- [47] J.S. Mills, R. White, L.J. Gough, *Chem. Geology*, **1984**, 47, 15-39
- [48] A.M. Pollard, C. Heron; *Archaeol. Chem.*, Cambridge **1997**
- [49] J.M. Delacotte, C. Hardouin, C. Rolando, *Analusis*, **1996**, 24 (7), 13-25
- [50] R.C.A. Rottländer, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 47, 4127-4128
- [51] R.C.A. Rottländer, *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 24, 2127-2128
- [52] H.J. Eichhoff, G. Mischer, *Z. Naturforsch.*, **1972**, 27a, 380
- [53] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Mc Graw-Hill, New York 2. Aufl. **1977**
- [54] J.S. Mills, R. White, *Stud. Conserv.*, **1977**, 22, 13-31
- [55] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworths, London **1986**
- [56] U. Sturm, *Dissertation*, Universität Hamburg **1982**
- [57] S. Moldoveanu, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry 20*, Elsevier, Amsterdam **1998**
- [58] S.A. Liebmam, E.J. Levye, *Pyrolysis and GC in Polymer Analysis*, Marcel Dekker, New York **1985**
- [59] W.J. Irwin, *Analytical Pyrolysis - a comprehensive guide*, Marcel Dekker New York **1982**
- [60] *Bedienungsanleitung zum Pyrojector II*, Fa. SGE
- [61] E. Schulte, *Praxis der Kapillar-Gaschromatographie*, Springer Verlag Berlin **1983**
- [62] W. Engewald, J.Teske, J.Efer, *J. Chromat. A*, **1999**, 856, 259-278
- [63] W. Kaminski, H. Sinn, *Am. Chem. Soc. Sys.*, **1980**, 130

- [64] F.G.R. Gimblett, *Indroductio to the Kinetics of Chemical Chain Reactions*, Mc Grow Hill, London **1970**
- [65] V. Dubey, R.K. Shrivastava et al., *J. Anal. Appl. Pyr.*, **1993**, 27, 207-219
- [66] G.O. Poinar, J. Haverkamp, *J. Baltic Stud.*, **1985**, 116 (3), 210-222
- [67] F.L. Scholten, A. Spooner, M. Smeltink, *Pyrolyse-FTIR*, Gastec, Apeldoorn **1994**
- [68] J. Rabek, *Polymer Photodegradation*, Chapman & Hall. London **1995**
- [69] G.O.Becker [Hrsg.], *Einführung in die Photochemie*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1991**
- [70] D. Wöhrle, M.W. Tausch, W.D. Stohrer, *Photochemie*, VCH Weinheim **1998**
- [71] H. Zollinger, *Color Chemistry*, VCH Weinheim, 2. Aufl. **1991**
- [72] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College, New York, 7. Aufl. **1996**
- [73] F. Arndt, *Org. Synth. Coll. Vol. II*, **1943**, 461-462
- [74] J.C. del Rio, D.E. Mc Kinney et al., *J Chromat. A*, **1998**, 823, 433-448
- [75] D. Fabbri, R. Helleur, *J. Anal. Appl. Pyr.*, **1999**, 49, 277-293
- [76] H.L. Hardell, *J. Anal. Appl. Pyr.*, **1993**, 27, 73-85
- [77] W.W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, Oil Press Glasgow **1992**, 69
- [78] R.J.P. Cannell, *Naturell Products Isolation*, Humana Press, Totowa **1998**
- [79] D. Lebez, *J. Chromat.*, **1968**, 33, 544-547
- [80] H. Henke, *J. Chromat. A*, **1983**, 254, 296-308
- [81] B. Nikolova- Damyanova, *Silver ion chromatography and lipids*, in W.W. Christie, *Advances in Lipid Methodology-one*, Oil Press Glasgow **1992**
- [82] K.K. Unger, E. Weber [Hrsg.], *Handbuch der HPLC*, GIT Verlag, Darmstadt **1995**
- [83] W.C. Brumley, C.M. Brownrigg, A.H. Grange, *J. Chromat.*, **1993**, 633 177-183
- [84] K. Koshab, R. Teasdale, *J. Chromat. A*, **1994**, 660, 195-198
- [85] G. Özdemir, *EMPA-Bericht 113/5*, Dübendorf **1992**
- [86] C.R. Enzell, R. Ryhage, *Arkiv Kemi*, **1964**, 23 (33), 367-397
- [87] C.R. Enzell, I. Wahlberg, *Terpenes and Terpenoids*, in G.R. Waller, O.C. Dermer, *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, VCH New York **1980**
- [88] H.E. Audier, S. Bory et al., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1966**, 3181-3192
- [89] H.E. Audier, S. Bory et al., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1966**, 4002-4015
- [90] D.F. Zinkel, L.C. Zank, M.F. Wesolowski, *Diterpene Resin Acids*, U.S. Dept. Agricult. Madison, Wisconsin **1971**
- [91] P. Jablonski, A. Golloch, W. Borchard, *Thermochimica Acta*, **1999**, 333 87-93
- [92] K.B. Anderson, R.E. Winans, *Anal Chem.* **1991**, 63, 2901-2908
- [93] P. Bocchini, M. Russo, G.C. Galletti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 1555-1563

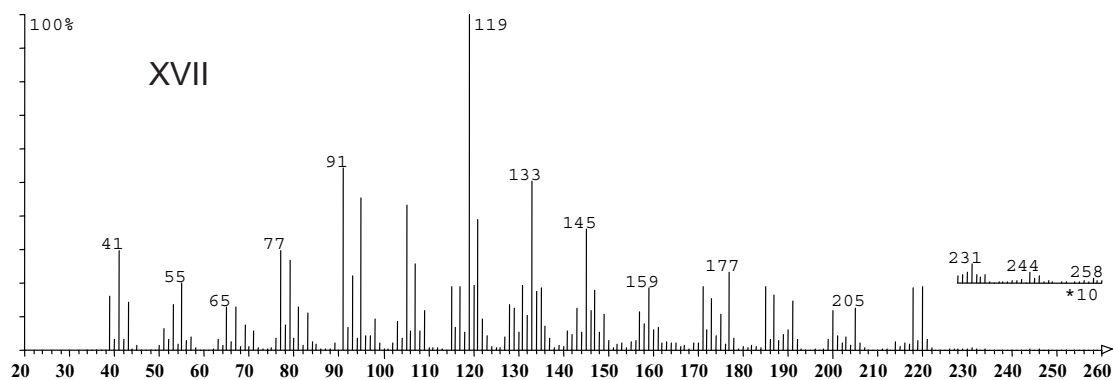
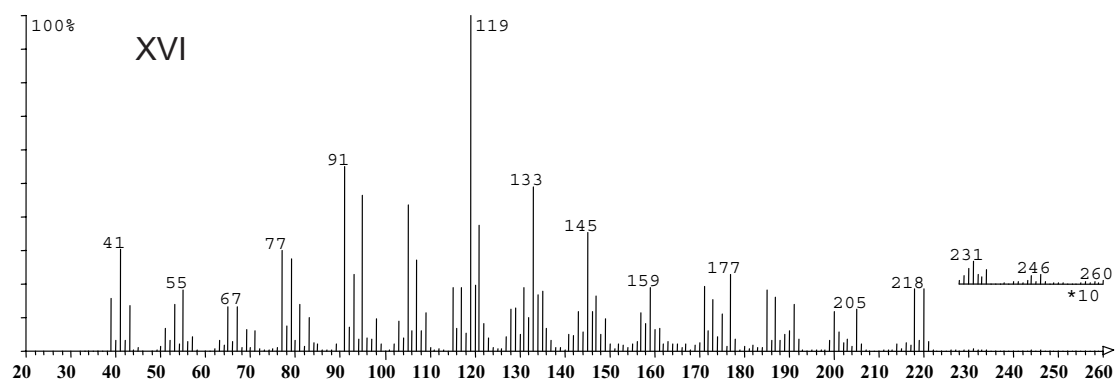
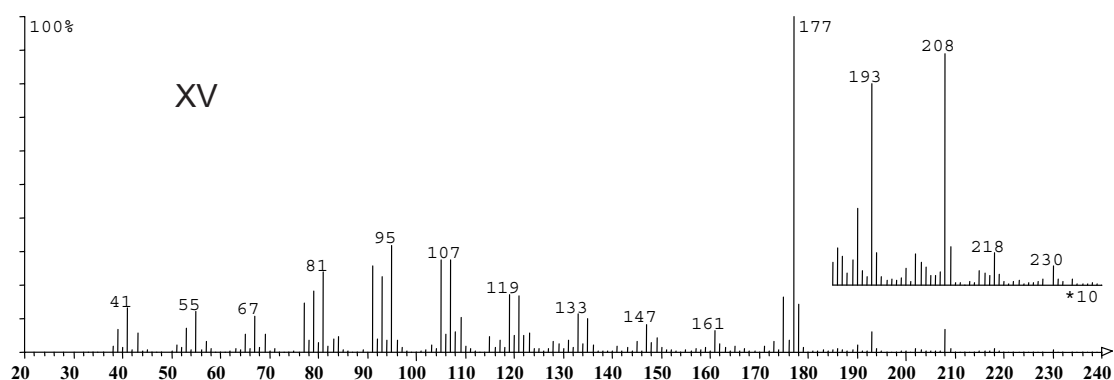
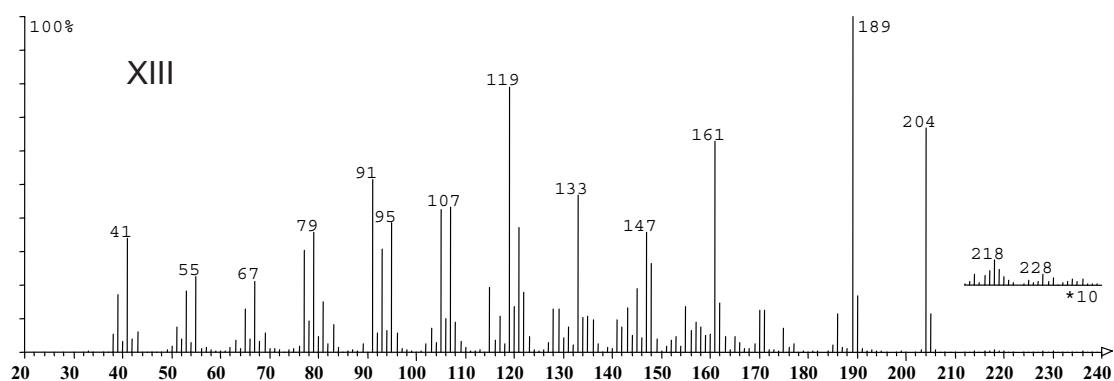
- [94] G. Chiavari, D.Fabbri et al., *Chromatographia*, **1995**, 41 (5), 273-281
- [95] *Wiley-Datenbank*, MassLib, PC V8.6-B5
- [96] *Datenbase/IRD/ Grams/32*
- [97] H.G. Elias, *Makromoleküle*, Bd.2 Hüthig & Wepf, Heidelberg 5. Aufl. **1992**
- [98] B. Vogler, I. Klaiber et al., *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61,175-178
- [99] K. Albert, *J. Chromat. A*, **1995**, 703, 123-147
- [100] S. Moldoveanu, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 215
- [101] W. König, *private Mitteilung*, Universität Hamburg **1999**
- [102] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, Hirzel, Stuttgart, 3. Aufl. **1997**
- [103] E. Breitmeier, *Terpene*, Teubner Studienreihe, Stuttgart **1999**
- [104] D. E. Cane [Ed.], *Isoprenoids including Carotenoids and Steroids*, Vol. 2, Elsevier **1999**
- [105] L.F. Fieser, M. Fieser, *Natural Products Related to Phenanthren*, Reinhold, New York **1949**
- [106] B.R.T. Simoneit, J.O. Grimalt et al., *Org. Geochem.*, **1986**,10, 877-889
- [107] M.H. Travendale, P.N. Mc Farlane et al., *Chemosphere*, **1997**,35 (10) 2137-2151
- [108] V.J.J. Martin, Z. Yu, W.W. Mohn, *Arch. Microbiol.*, **1999**,172, 131-138
- [109] W.M. Mohn, A.E. Wilson, P. Bicho, E.R.B. Moore, *System. Appl. Microbiol.*, **1999**, 22, 68-78
- [110] M.H. Travendale, P.N. Mc Farlane et al., *Chemosphere*, **1997**,35 (10) 2153-2165
- [111] B. Schink, A. Brune, S. Schnell, *Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds*, in G. Winkelmann [Ed.], *Microbial Degradation of Natural Produkts*, VCH, Weinheim **1992**
- [112] W. Schnabel, *Polymer Degradation*, Hanser, New York **1983**
- [113] DGMK-Forschungsbericht 461-01, *Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen*, Hamburg **1991**
- [114] C. Ratledge, *Biochemistry of microbial degradation*, Kluver Academic Dordrecht **1994**
- [115] D.D. Perrin, W.F. Armarego, D.R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, London 2. Aufl. **1980**

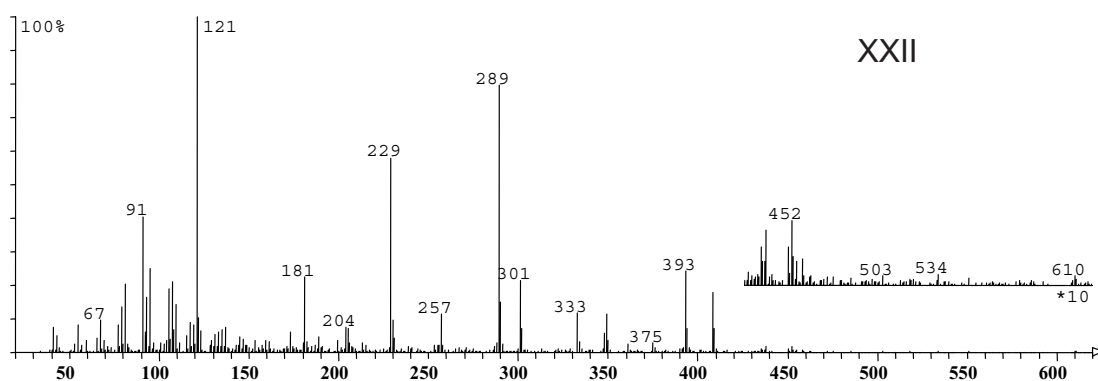
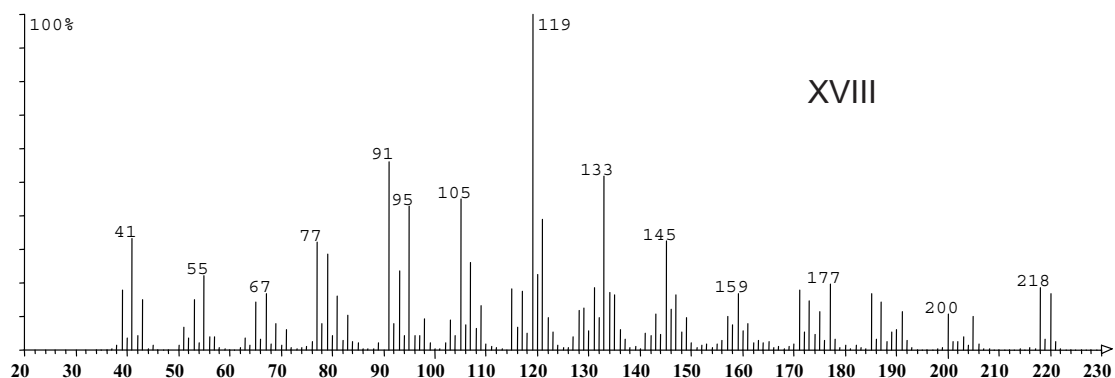




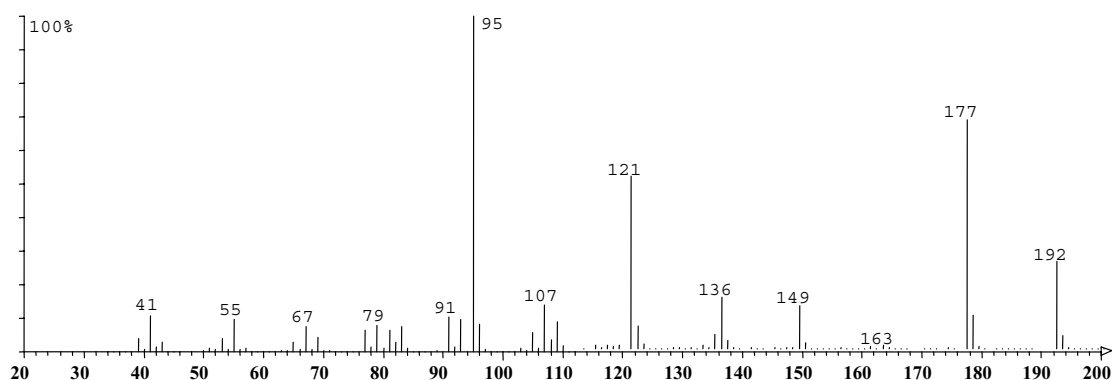


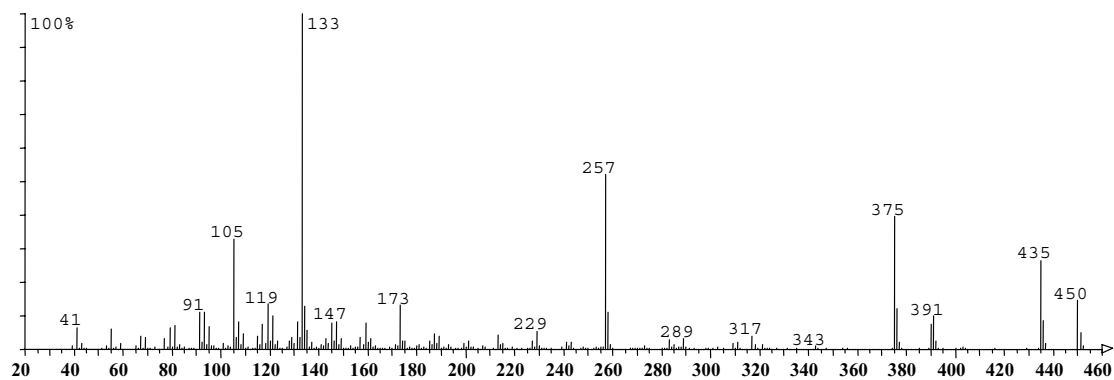
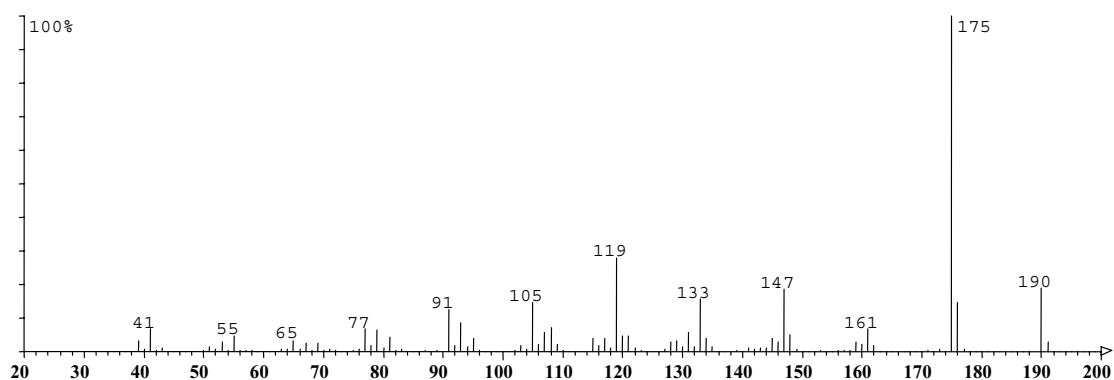
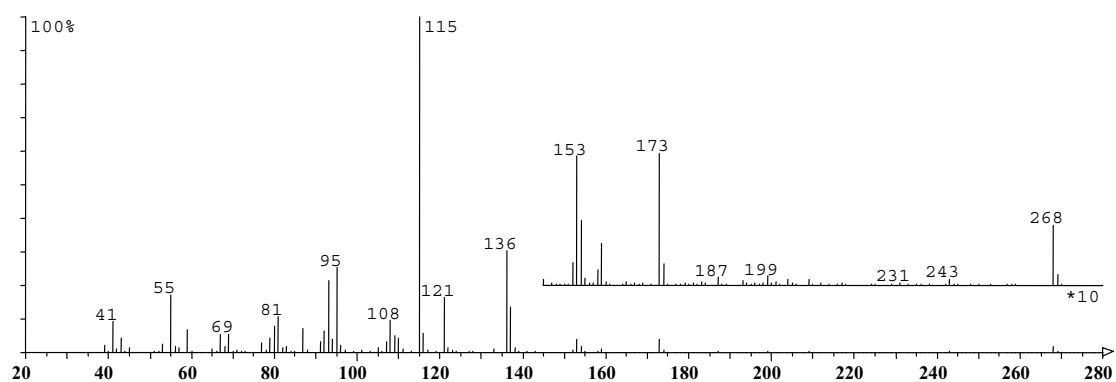
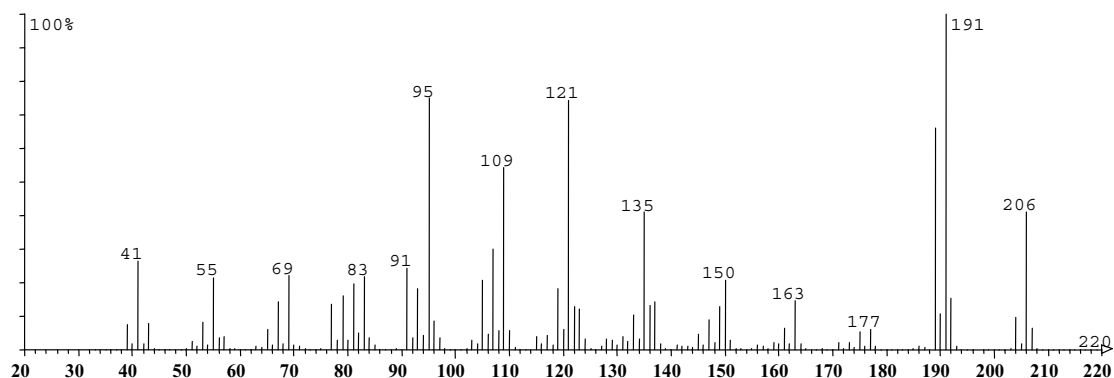


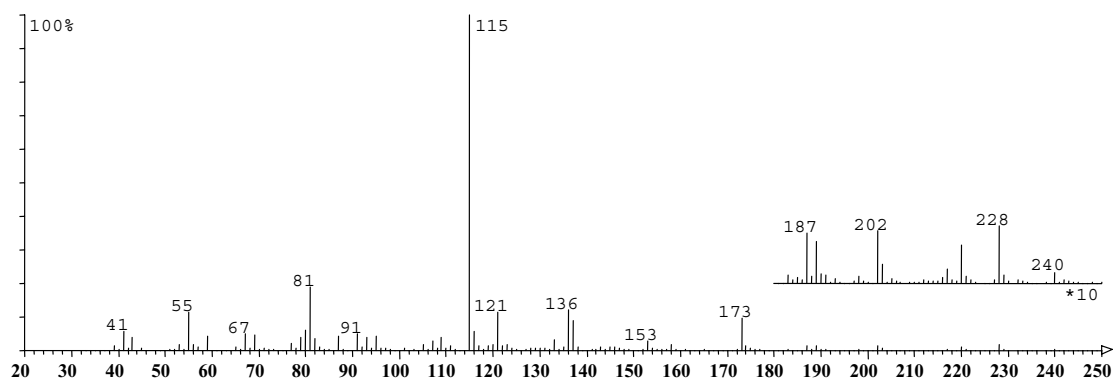
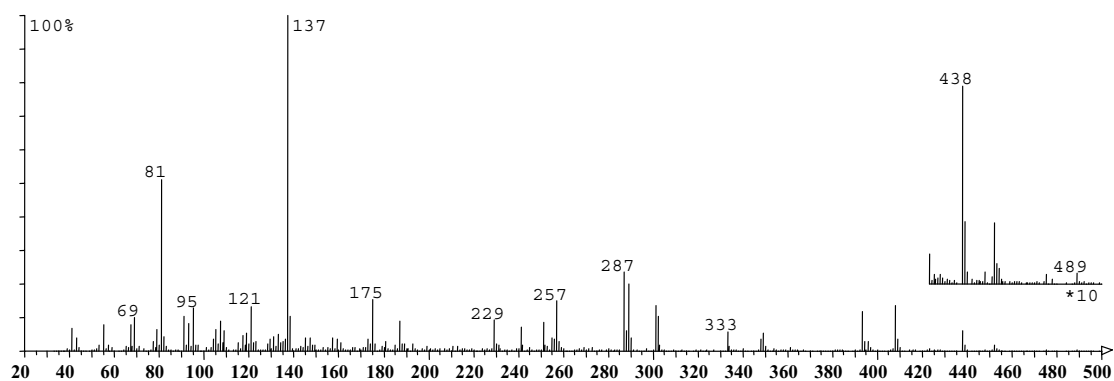
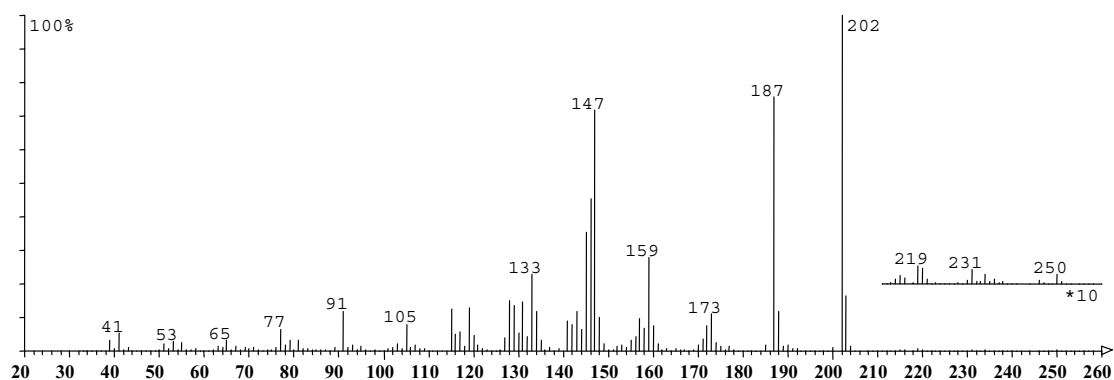
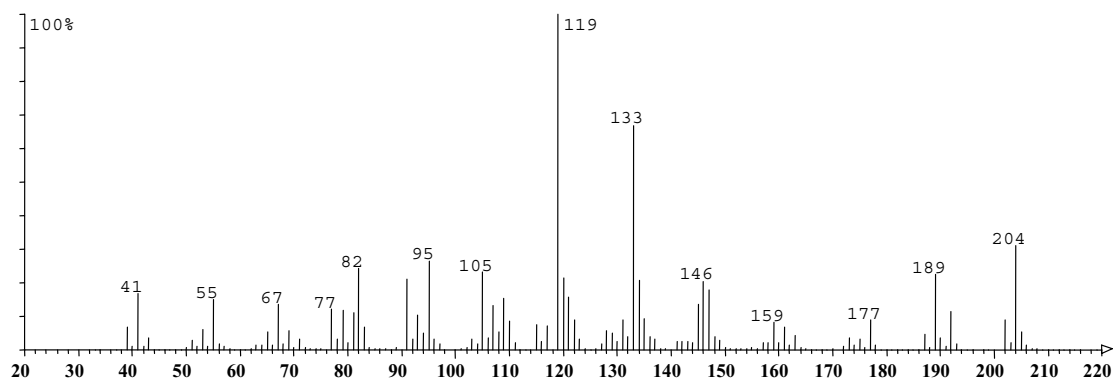




Die nachfolgenden unbeschrifteten Spektren stehen exemplarisch für je eine homologe Reihe mit charakteristischen Fragmentationen. Diese sind in den Tabellen 11-19, Kap. 5.5 beschrieben.







Die beiden folgenden Spektren zeigen, daß auch deutlich höhere Massenfragmente detektiert wurden, die über  $m/z=400$  lagen. Eine Identifizierung der zugrunde liegenden Verbindung war nicht möglich.

